



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA - UNIR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL -
PGBIOEXP

BRUNA CAROLINE FONTANA TORRES

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES “TOLL-LIKE” NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO
DE CAMUNDONGOS INDUZIDA PELA PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu* E
POR DUAS FOSFOLIPASES A₂ (BthTX-I e BthTX-II) ISOLADAS**

Porto Velho
2017



BRUNA CAROLINE FONTANA TORRES

EXPRESSÃO DE RECEPTORES “TOLL-LIKE” NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE CAMUNDONGOS INDUZIDA PELA PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu* E POR DUAS FOSFOLIPASES A₂ (BthTX-I e BthTX-II) ISOLADAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental/UNIR como requisito para a obtenção do título de mestre em Biologia Experimental.

Orientadora: Dr^a. Giselle Martins Gonçalves
Co-orientadora: Dr^a. Juliana Pavan Zuliani

Porto Velho

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

T693e Torres, Bruna Caroline Fontana.

Expressão de receptores "Toll-like" no músculo gastrocnêmio de camundongos induzida pela peçonha de *Bothrops jararacussu* e por duas fosfolipases A2 (BthTX-I e BthTX-II) isoladas / Bruna Caroline Fontana Torres.
86 f. : il.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Giselle Martins Gonçalves

Coorientador(a): Prof.^a Dra. Juliana Pavan Zuliani.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1. Receptores. 2. Toll-like. 3. Miotoxinas. 4. Peçonha. 5. Serpente. I. Gonçalves, Giselle Martins. II. Título.

CDU 591.145

Autor: Bruna Caroline Fontana Torres

Título da Dissertação: Expressão de receptores “Toll-like” no músculo gastrocnêmio de camundongos induzida pela peçonha de *Bothrops jararacussu* e por duas fosfolipases A₂ (BthTX-I e BthTX-II) isoladas

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia como requisito para a obtenção do título de mestre em Biologia Experimental.

Orientadora: Dr^a. Giselle Martins Gonçalves

Co-orientadora: Dr^a. Juliana Pavan Zuliani

Examinador: _____


Dr^a. Giselle Martins Gonçalves

Docente Departamento de Medicina - UNIR/ Docente Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental - PGBioEXP/UNIR

Examinador: _____

Dr. Anderson Makoto Kayano

Pesquisador Centro de Biomoléculas Aplicadas à Saúde - CEBio/ FIOCRUZ-RO

Examinador: _____

Dr^a. Luciana Gatto Brito

Pesquisadora Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA-RO

Porto Velho – RO

Aprovada: 19 de setembro de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus!

Aos meus queridos pais,

*que se dedicaram na minha criação e sempre transferiram a
mim um amor incondicional, me deram a oportunidade de ser
uma pessoa melhor e a liberdade para escolher os meus
caminhos!*

Ao meu marido,

*que sempre me incentivou, apoiou e me deu forças para
prosseguir nessa caminhada!*

A minha filha Mariana,

que ainda nem nasceu e já é tão amada!

Aos familiares e amigos,

que sempre torceram por mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me carregar em seus braços em todos os momentos da minha vida, me trazendo até aqui, pois sem ele eu não conseguiria;

Ao meu **marido Daydson** por todo o carinho, amor, apoio, dedicação, paciência, compreensão, companhia nas noites mal dormidas... e por tudo o que representa na minha vida;

À minha **orientadora Dr^a Giselle Martins Gonçalves**, por toda a paciência, dedicação, por não ter medido esforços para me **ensinar**, auxiliar, orientar... por ter sempre uma palavra de incentivo, me fazendo acreditar que poderia vencer;

Agradeço imensamente a minha co-orientadora, **Dr^a Juliana Pavan Zuliani** pela oportunidade e pelo apoio material e teórico, sem os quais não seria possível o desenvolvimento de diversas atividades pertinentes a este trabalho;

À doutora **Dr^a Sulamita da Silva Setúbal**, pelo incentivo, apoio, amizade e ensinamentos;

Aos **colegas do laboratório de Imunologia celular** pelo apoio;

À colega MSc. **Letícia Helena de Carvalho** pelo auxílio e ensinamentos;

Aos demais **colegas do mestrado**, pela amizade, ensinamentos, troca de experiências, gargalhadas e momentos especiais que passamos juntos;

À futura **Dr^a Leda**, pelo material teórico cedido.

À minha amiga especial, MSc. **Erica Vitoria Almeida**, por ter me incentivado a iniciar no mestrado e por ser um exemplo de força e dedicação;

Às colegas **Neusa e Amália** pelo auxílio e por serem sempre tão amáveis;

Às alunas de iniciação científica **Sara e Natália**, pelo auxílio e companheirismo durante importantes etapas deste trabalho;

Ao colega mestrando **André Vynicius Pereira**, pelo auxílio prestado;

À **Dr^a Thamy Yamashita Shibayama** pelo auxílio prestado;

Ao Dr. **Andreimar Martins Soares** e a equipe do Centro de Biomoléculas, por terem purificado e cedido as toxinas, de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. **Roberto Nicolete** e a sua esposa **Larissa Nicolete** pelo apoio material e a gentileza;

À futura Dr^a **Alcione dos Santos Oliveira** e aos **demais colaboradores** do Laboratório de virologia do CEPEM pelo auxílio e por serem sempre tão prestativos;

À **Fiocruz Rondônia** pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho em suas dependências;

À **CAPES** e **CNPQ** pelo apoio financeiro;

Aos **membros da banca examinadora**, que disponibilizaram seu tempo para avaliar este trabalho.

Enfim, à todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

O meu muito obrigada a todos!

Tudo posso naquele que me fortalece!
(Filipenses 4:13).

RESUMO

Os acidentes ofídicos se caracterizam como um grave problema de saúde pública devido a sua alta incidência, afetando principalmente pessoas de baixa renda que vivem em áreas isoladas ou de difícil acesso a unidades de tratamento, podendo ocasionar assim, incapacidade do membro atingido, amputações ou em casos mais graves a morte do indivíduo. No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops*, são causadoras de 90% dos envenenamentos, sendo a *Bothrops jararacussu*, uma das que mais se destaca por inocular grandes quantidades de peçonha na sua presa provocando ações miotóxicas, proteolíticas, coagulantes e hemorrágicas. Dados na literatura mostram que as fosfolipases A₂ isoladas de toxinas de serpentes do gênero *Bothrops* estão envolvidas na resposta inflamatória local. No entanto, os mecanismos pelos os quais as toxinas de serpentes desencadeiam esse processo, ainda não foram elucidados. Os receptores *Toll-Like* (TLRs) são proteínas transmembrana que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou ainda, padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Após esse reconhecimento, é ativada uma cascata de sinalização que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias e consequente resposta imune inata. Dessa forma, a proposta deste trabalho foi estudar a participação de diferentes TLRs durante o processo inflamatório local induzido pela peçonha e duas fosfolipases A₂ isoladas da serpente *B. jararacussu*. Para isso, doses sub-letais de peçonha de *B. jararacussu*, ou BthTX-I ou BthTX-II foram aplicados por via i.m em modelos murinos. A atividade miotóxica foi avaliada por análise histológica e pela quantificação dos níveis plasmáticos de CK-total. A produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β foi dosada do tecido muscular e do plasma por método imunoenzimático – ELISA. Foi realizada a quantificação da expressão gênica dos TLRs 2, 4, 5 e 9 nos tecidos pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RTq-PCR). De acordo com os resultados, pode-se observar que a peçonha e suas toxinas provocaram alterações teciduais caracterizando mionecrose e infiltrado neutrofílico; também induziram a um significativo aumento de CK na corrente sanguínea dos murinos; assim como, levaram a um aumento de TNF- α e IL-1 β nos animais testados quando comparados ao controle. Ainda, os resultados apontaram importante aumento na expressão dos TLR2 e TLR4. A participação desses receptores na inflamação provocada pela peçonha de *B. jararacussu* e suas fosfolipases sugere que os TLRs são importantes alvos para o desenvolvimento de futuras terapias no que diz respeito a inflamação provocada pelos envenenamentos ofídicos ou por fosfolipases A₂ miotóxicas.

PALAVRAS CHAVE: Receptores. Toll-Like. Miotoxinas. Peçonha. Serpente.

ABSTRACT

The snakebites are characterized as a serious public health problem due to its high incidence, mainly affecting low-income people living in isolated areas or difficult access to treatment facilities, thereby causing, inability of the affected limb, amputations or more cases serious death of the individual. In Brazil, the snakes of the genus *Bothrops* are causing 90% of poisonings, and the *Bothrops jararacussu*, one that stands out by inoculating large amounts of venom in his prey causing myotoxic, proteolytic, coagulant and hemorrhagic actions. Data in the literature show that phospholipase A2 isolated from *Bothrops* snakes toxins are involved in the local inflammatory response. However, the mechanisms by which the snake toxins trigger this process have not yet been elucidated. Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins that recognize molecular patterns associated with pathogens (PAMPs), or even damage associated molecular patterns (damps). After this recognition is activated a signaling cascade that results in the production of proinflammatory cytokines and the innate immune response resulting. Thus, the aim of this study was to investigate the participation of different TLRs during the local inflammatory process induced by the venom and two isolated phospholipase A2 serpent *B. jararacussu*. To this end, sub-lethal doses of venom of *B. jararacussu*, or BthTX-BthTX I or II were applied via i.m. in murine models. The myotoxic activity was evaluated by quantifying plasma levels of CK-total and by histological analysis. The production of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β was measured in the muscle tissue and plasma by enzyme immunoassay - ELISA. It was performed to quantify the gene expression of TLRs 2, 4, 5 and 9 in the tissues by the method of polymerase chain reaction in real time (RTQ-PCR). According to the results, it can be observed that it is a venom and its toxins were provoked with physical tissues and neutrophilic infiltrate; They also induced a significant increase in CK in murine bloodstream; As, they led to an increase of TNF- α and IL-1 β in the tested animals when compared to the control. Furthermore, the results showed a significant increase in the expression of TLR2 and TLR4. The involvement of these receptors in inflammation caused by the venom phospholipases and their *B.jararacussu* suggests that TLR are important targets for the development of future therapies with respect inflammation caused by snake venom or myotoxic phospholipases A2.

KEY WORDS: Receptors. Toll-Like. Myotoxins. Venom. Snake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição geográfica da espécie <i>Bothrops jararacussu</i> no Brasil	13
Figura 2: Representação esquemática das vias de sinalização dos TLRs	18
Figura 3: Distribuição dos TLRs em membrana externa e endossômica	19
Figura 4: Histologia de tecido muscular de camundongos	34
Figura 5: Efeito miotóxico de BjussuV, BthTX-I e BthTX-II sobre camundongos Swiss	36
Figura 6: Expressão de TLR2 em tecido muscular de camundongos	38
Figura 7: Expressão de TLR4 em tecido muscular de camundongos	40
Figura 8: Expressão de TLR5 em tecido muscular de camundongos	42
Figura 9: Expressão de TLR9 em tecido muscular de camundongos	44
Figura 10: Produção de TNF- α no tecido muscular e no plasma de camundongos	47
Figura 11: Produção de IL-1 β no tecido muscular e no plasma de camundongos	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Asp- Aspartato

BjussuV – Peçonha de *Bothrops jararacussu*

BthTX-I- Bothropstoxina I

BthTX-II- Bothropstoxina II

cDNA- Sequência complementar de ácido desoxirribonucleico

CK- Creatina quinase

CpG - DNA não metilado: citosina-fosforotioato-guanina - CpG

DAMPs – Padrões moleculares associados aos danos

HMGB1- Proteína de alta mobilidade BOX 1

HSP- proteínas de choque térmico

i.m – Injeção intramuscular

IL-1 β – Interleucina 1 beta

LPS - lipopolissacarídeo

Lys- Lisina

MyD88 – Fator de diferenciação mieloide

NFkB - Fator de transcrição de citocinas

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PGE2 – Prostaglandina 2

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PRR- Receptores de reconhecimento de padrões

RNA – Ácido ribonucleico

RTq-PCR - Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

s.s.f. – Solução fisiológica salina estéril

sPLA₂s - Fosfolipases A₂ secretadas

TLR – Receptor *Toll Like*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Toll/IL-1- Porção citosólica do Toll semelhante ao receptor de IL-1

TRIF- do inglês “TIR *domain-containing adaptor inducing interferon*”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 RECEPTORES COMO TOLL (TOLL LIKE RECEPTOR - TLR)	16
1.2 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	23
1.3 JUSTIFICATIVA	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 PEÇONHA E TOXINAS	27
3.2 DOSAGEM PROTEICA	27
3.3 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS	27
3.4 ANIMAIS	28
3.5 ENVENENAMENTO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	28
3.6 ATIVIDADE MIOTÓXICA	28
3.6.1 <i>Lâminas histológicas</i>	28
3.6.2 <i>Níveis plasmáticos de creatina quinase</i>	29
3.7 HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS	29
3.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	30
3.9 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR	30
3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR EM TEMPO REAL	31
3.11 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	31
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS	33
4.1 ATIVIDADE MIOTÓXICA	33
4.1.1 <i>Análise histológica</i>	33
4.1.2 <i>Aumento dos níveis de CK no plasma</i>	35
4.2 AUMENTO DA EXPRESSÃO DOS TLRs	37
4.2.1 <i>Aumento da expressão de TLR2</i>	37
4.2.2 <i>Aumento da expressão de TLR4</i>	39
4.2.3 <i>Quantificação da expressão de TLR5</i>	41
4.2.4 <i>Quantificação da expressão de TLR 9</i>	43
4.3. PRODUÇÃO DE CITOCINAS	45
4.3.1 <i>Produção de TNF-α no tecido muscular</i>	45
4.3.2 <i>Produção de TNF-α no plasma</i>	45
4.3.3 <i>Produção de IL-1β no tecido muscular</i>	48
4.3.4 <i>Produção de IL-1β no plasma</i>	48
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO	84
APÊNDICE	85

1 INTRODUÇÃO

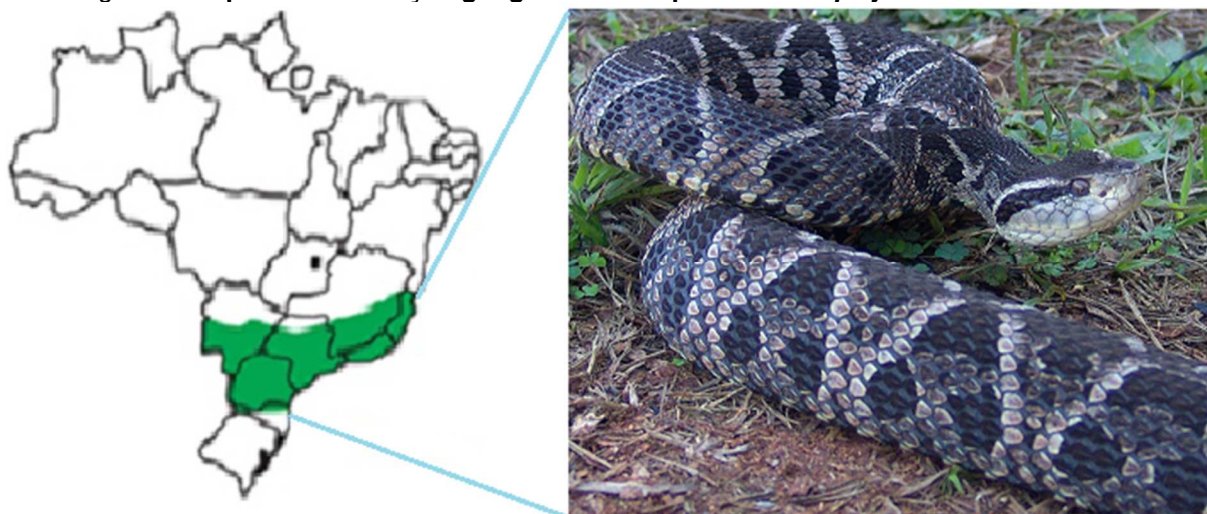
Os envenenamentos ocasionados por mordidas de serpentes peçonhentas são considerados como importante problema de saúde pública em decorrência de sua alta prevalência, mortalidade e significativas sequelas (GUTIÉRREZ et al., 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde - WHO (2016) cerca de 5 milhões de pessoas são vítimas de acidentes por serpentes no mundo, ocasionando até 2,5 milhões de envenenamentos e levando a óbito mais de 100 mil todos os anos. Esse elevado número de acidentes por serpentes leva a grande número de amputações, e/ou incapacitação do membro atingido, contribuindo para o agravamento dos problemas no Sistema Único de Saúde (SUS). Em adicional, os acidentes ofídicos afetam, na maioria dos casos, pessoas de baixa renda, moradores de regiões ribeirinhas ou de áreas rurais (KINDHAUSER, 2003). Devido a esse perfil, o ofidismo não é um foco de investimentos principalmente por parte das indústrias farmacêuticas. Desta forma, em 2007, a Organização Mundial de Saúde – OMS em uma reunião em Genebra na Suíça declarou o ofidismo como uma condição negligenciada (WHO, 2007) e, em 2009 incluiu em sua lista de doenças tropicais negligenciadas. Porém apesar de continuar sendo uma condição negligenciada, hoje o ofidismo não se encontra mais na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde.

No ano de 2015, no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorreram 24.467 casos de ofidismo, com um coeficiente de incidência de 13,3 casos por 100.000 habitantes e um total de 107 óbitos descritos. Se levarmos em conta as regiões do país há uma grande variabilidade deste coeficiente sendo que a região norte é a mais afetada com uma incidência de 8.192 casos registrados dos quais 34 pessoas vieram a óbito, ficando em segundo lugar a região nordeste com 6.670 casos e 43 óbitos, seguida pela região sudeste com 5.200 ocorrências e 19 óbitos, Centro-Oeste 2.252 registros e 4 óbitos e Sul 2.153 casos sendo 7 fatais. (BRASIL, 2015).

Essa casuística elevada no Brasil deve-se ao fato de serem descritas 30 espécies de serpentes pertencentes a família *Viperidae*, distribuídas em 4 gêneros: *Bothrochophias*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (COSTA; BERNILS, 2014). Dentre

eles, as pertencentes ao gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos envenenamentos ofídicos, com um percentil de 90% dos casos (GUTIÉRREZ et al., 2010). As serpentes da espécie *Bothrops jararacussu* são representantes desse gênero, podendo medir até 1,8 metros (MINAS GERAIS, 2014). A mordida desta serpente costuma ocasionar acidentes graves, quando não a morte, pois se trata de uma serpente que produz e pode inocular grandes quantidades de peçonha (MILANI JÚNIOR et al., 1997; MELGAREJO, 2003). Elas estão distribuídas em sua maioria na região Sudeste e Sul do Brasil (BRASIL, 2001), ocupando desde o sul da Bahia até o noroeste do Rio Grande do Sul (MELGAREJO, 2003) (Figura 1). Nessas regiões a *B. jararacussu* está associada a inúmeros acidentes, deixando sequelas graves em suas vítimas ou levando a morte (AMARAL et al., 1985; QUEIROZ; MORITZ, 1989; MILANI JR et al., 1997; RIBEIRO; JORGE, 1997).

Figura 1: Mapa de distribuição geográfica da espécie *Bothrops jararacussu* no Brasil



Mapa (esquerda), *Bothrops jararacussu* (direita) Foto: Daniel Loebmann (foto publicada com autorização do autor).

As manifestações relatadas após mordida por *B. jararacussu* costumam ser equimose, hemorragia local e sistêmica (pulmonar, cardíaca e cerebral), necrose, mionecrose, distúrbio na coagulação, trombose, falência renal, coagulação intravascular disseminada, fibrose do miocárdio e choque (MILANI JR et al, 1997; PINHO; BURDMANN, 2001; BENVENUTI et al., 2003). Essa variabilidade de manifestações se devem a complexidade das peçonhas de serpentes que são compostas por componentes bioativos como peptídeos e proteínas (cerca de 95% do peso seco) que possuem diversas atividades biológicas, cuja principal função é provocar paralisia e digestão da presa (BARRAVIEIRA, 1994; QUEIROZ et al., 2008).

As peçonhas de *Bothrops*, possuem proteínas com ações miotóxicas (LEITE et al., 1999), hemorrágicas, neurotóxicas, nefrotóxicas, edematogênicas, fibrinogenolíticas e coagulantes (SOARES et al., 2000; IZIDORO, 2003), além de causarem intensa atividade inflamatória local caracterizada pela presença de dor e edema (TEIXEIRA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2009).

Dentre as proteínas que compõem as peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* se encontram as desintegrinas e lectinas sendo responsáveis principalmente por ações anticoagulantes e hemaglutinantes; metaloproteases proteolíticas, hemorrágicas, miotóxicas, inflamatórias e coagulantes; serinoproteases coagulantes e proteolíticas; e fosfolipases edematogênicas, miotóxicas, neurotóxicas, cardiotoxinas, inflamatórias entre outras, sendo estas últimas presentes em maior abundância nas peçonhas de *Bothrops* (MAGRO et al, 2004; WATANABE et al., 2005; ZULIANI et al., 2005; PANUNTO et al., 2006; ANGULO; LOMONTE, 2009; MENALDO et al, 2012; RODRIGUES, et al., 2014; ANGULO et al., 2014; SARTIM et al., 2015; ZAQUEO et al., 2016).

As miotoxinas presentes nas peçonhas de serpentes podem ser classificadas em três diferentes grupos sendo A, B e C, essas diferentes designações estão associadas principalmente aos seus tamanhos quanto ao número de aminoácidos formadores, forma e funções. As toxinas do grupo A são pequenas com aproximadamente 44 aminoácidos, não possuem ação enzimática e são encontradas em cascavéis. No grupo B se encontram proteínas um pouco maiores, consideradas cardiotoxinas presentes em *Elapidae*. O grupo C é formado por proteínas compostas por aproximadamente 120 aminoácidos, conhecidas por fosfolipases e são difundidas nas mais diversas espécies de animais (OGUIURA et al., 2005; KINI; DOLEY, 2010; LOMONTE; RANGEL, 2012).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são responsáveis por hidrolisar o grupo acila na posição sn-2 dos fosfolipídeos. Atualmente, a superfamília das PLA₂ está dividida em 16 grupos, podendo ainda ser classificadas em seis principais categorias de acordo com suas características quanto a composição, peso molecular, exigência ou não de cálcio, sítio de atuação, entre outras: i - secretadas de baixo peso molecular (sPLA₂s); ii - citosólica e cálcio dependente (cPLA₂s); iii - independentes de cálcio – (iPLA₂s); iv - acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH), v - lisossomais – (LPLA₂) e vi - adiposas (AdPLA) (DUNCAN et al., 2008; BURKE; DENNIS, 2009a; BURKE; DENNIS, 2009b; DENNIS et al, 2011). As PLA₂s secretadas estão distribuídas em 10

grupos os quais foram classificados de acordo com suas pontes dissulfeto e ordem de descoberta: I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV. Este grupo de sPLA₂s compõe o sítio ativo Histidina/Aspartato requerendo quantidades milimolares de cálcio para exercer atividade catalítica (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; DENNIS et al., 2011).

As sPLA₂s pertencentes ao grupo III estão presentes em peçonhas de insetos como abelhas, demais artrópodes como escorpiões e lagartos (DENNIS et al., 2011; LOMONTE; RANGEL, 2012). No grupo I são encontradas as PLA₂s de serpentes da família Elapidae (IA), além das encontradas no suco pancreático de mamíferos (IB) e, no grupo II, se encontram as enzimas secretadas de serpentes Viperidae e as presentes no fluido sinovial de mamíferos (IIA), além das secretadas por víboras (IIB) (BURKE; DENNIS, 2009a; BURKE; DENNIS, 2009b; DENNIS et al., 2011; LOMONTE; RANGEL, 2012; CASAIS-E-SILVA et al., 2016), desta forma, as fosfolipases secretadas de serpentes *Bothrops* são designadas sPLA₂s do grupo IIA. As sPLA₂s do grupo I são dependentes de atividade enzimática para induzir miotoxicidade, já as sPLA₂s do grupo II podem ser divididas em enzimaticamente ativas e enzimaticamente inativas (LOMONTE; RANGEL, 2012; CASAIS-E-SILVA et al., 2016). As sPLA₂s IIA podem ser ácidas ou básicas, porém apenas as básicas induzem a miotoxicidade (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

Em mamíferos as sPLA₂ tem a função básica de catalisar a hidrólise de fosfolipídios na ligação éster sn-2 liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, ativando assim a cascata do ácido araquidônico, resultando em produtos eicosanóides: prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos, que são responsáveis por exercer diversos papéis fisiológicos e inflamatórios (MOREIRA et al., 2011; CLEMENT et al., 2012). Dados da literatura demonstram que as fosfolipases A₂ secretadas de serpentes estão envolvidas na resposta inflamatória local após indução com peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* (CHAVES; MAMED et al., 2013; RUEDA et al., 2013).

A partir da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, foram isoladas duas importantes fosfolipases miotóxicas a Bothropstoxina I (BthTX-I) e a Bothropstoxina II (BthTX-II) as quais possuem cerca de 75% de similaridade (HOMSIBRANDEBURGO et al., 1988). A BthTX-I, corresponde a uma PLA₂ básica com peso molecular de 13,667 KDa e 121 resíduos de aminoácidos, no qual encontra-se na posição 49 o resíduo de lisina (Lys-49) responsável pela destituição da atividade catalítica. A BthTX-II, uma PLA₂ que apresenta aspartato na posição 49 (Asp-49), conferindo

atividade enzimática (CINTRA et al., 1993; WARD et al., 1995; HOMSIBRANDEBURGO et al., 1988; MARCUSSI, 2007). Mesmo desprovida de atividade enzimática, a PLA₂ - Lys 49 é altamente miotóxica (SCOTT et al., 1992; OWNBY et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2003) e essa miotoxicidade é independente do íon cálcio (ARAGÃO et al., 2009).

A literatura documenta que há necessidade de se compreender como as sPLA₂s miotóxicas agem, tendo em vista que a atividade enzimática e o íon cálcio não são essenciais para a miotoxicidade (RUEDA et al., 2013). Estudos mostraram que essas PLA₂s podem se ligar à membrana das células por meio de receptores celulares como por exemplo os do tipo M presentes em células musculares ou do tipo N presentes em células neuronais, porém esses receptores não são a chave para o efeito miotóxico dessas PLA₂s, uma vez que elas continuam provocando ação miotóxica em células desprovidas desses receptores (LAMBEAU et al., 1994; LAMBEAU; LAZIDUNSKI, 1999).

Adicionalmente essas toxinas causam perturbações à membrana plasmática por meio de ação direta à membrana (Asp-49) ou pela ligação da região C-terminal (Lys-49) da proteína com a região polar dos fosfolipídeos (GUTIÉRREZ et al., 1991; MONTECUCCO et al., 2008). Ambas as miotoxinas causam alterações do sarcolema induzindo a entrada de Ca²⁺ e perda de ATP e de K⁺ provocando mionecrose por meio de mecanismos ainda pouco conhecidos (FERNÁNDEZ et al., 2013). Apesar de não haver total conhecimento sobre os mecanismos pelos quais as fosfolipases provocam a miotoxicidade, sabe-se que após a indução por essas fosfolipases ocorre um importante influxo de íons e liberação de proteínas para o meio extracelular, o que ocasiona o processo de necrose das fibras do músculo culminando com intensa reação inflamatória (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ et al., 1991; PAIVA-OLIVEIRA et al., 2012). Desta forma, as fosfolipases Lys-49 e Asp-49 de *Bothrops* são responsáveis não apenas por eventos miotóxicos, como também pela inflamação local induzida por essas toxinas (TEIXEIRA et al., 2003) provocando dor, edema e infiltrado leucocitário.

1.1 RECEPTORES COMO TOLL (TOLL LIKE RECEPTOR - TLR)

Os receptores *Toll* foram identificados pela primeira vez em moscas *Drosophila melanogaster* por serem responsáveis pelo alinhamento dorsoventral desses insetos (HASHIMOTO et al., 1988). Anos mais tarde (1996) Jules A. Hoffmann descobriu que

esses receptores têm um papel essencial na imunidade dessas moscas à infecção provocada por fungos, ativando mecanismos antimicrobianos (LEMAITRE et al., 1996). A partir dessa descoberta foram identificados receptores homólogos a esses, em mamíferos, aos quais deram o nome de *Toll-Like receptors* - TLR (receptores como *Toll*), fazendo alusão ao *Toll* de *Drosophilas*. O primeiro TLR de mamíferos que teve a sua função identificada foi o TLR4 sendo responsável por reconhecer lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas (TAKEDA et al., 2003).

Dados recentes vêm mostrando cada vez mais a importância desses receptores em leucócitos como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células epiteliais e musculares, pois possuem a capacidade de reconhecer padrões moleculares, os chamados receptores de reconhecimento de padrões - PRR (do inglês "*pattern recognition receptor*"). Existem várias famílias de PRRs, tais como receptores *RIG-I-like* (RLRs), receptores *NOD-like* (NLRs) e receptores de DNA, conhecidos por desempenhar precioso papel na defesa dos organismos hospedeiros (ALBERTS et al., 2010; KUMAR et al., 2011; HENRIQUES-PONS et al., 2014).

O reconhecimento de padrões via PRR desencadeia a resposta inflamatória, assim como modula essa resposta nas mais diversas doenças infecciosas e não infecciosas (MICERA et al., 2015; PANDEY et al., 2015), estando envolvidos também na imunidade adaptativa (LEADBETTER et al., 2002) e em doenças autoimunes (GOECKERITZ et al., 1999; KRIEG, 2002). No entanto, pouco sabe-se a respeito destes receptores no processo inflamatório induzido pelo envenenamento ou por PLA₂ miotóxicas (OLIVEIRA, 2011; PAIVA-OLIVEIRA et al., 2012; LEIGUEZ et al., 2014).

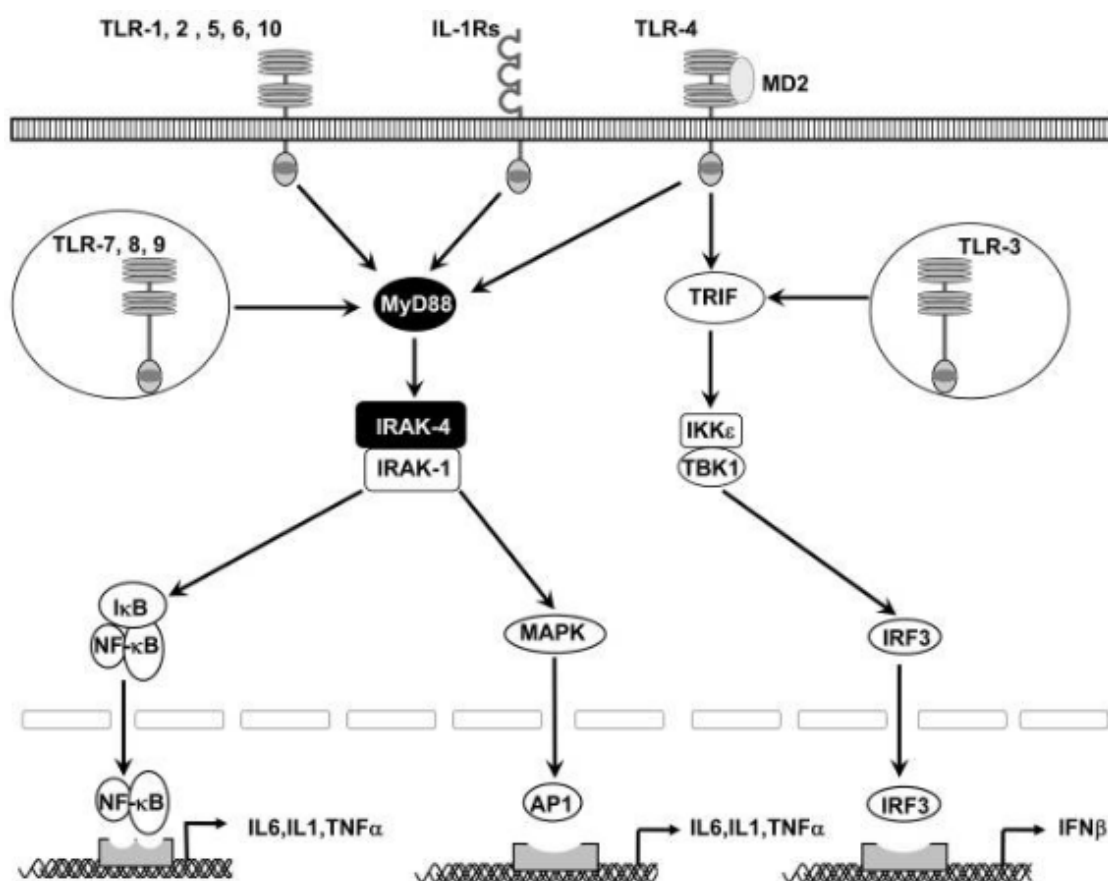
Quanto a localização, esses receptores podem se apresentar associados a membrana das células (receptores de membrana) e também podem se apresentar dispersos no citosol ou em membranas endossômicas (receptores citosólico) (KAWAI; AKIRA, 2010,).

A família de PRR de membrana mais bem estudada é a dos TLR (do inglês "*toll-like receptor*"). Os TLRs são receptores transmembrana do tipo I com um domínio citoplasmático e um domínio extracelular contendo, ao menos, 15 repetições de aminoácidos do tipo leucina (LRRs – repetições ricas em leucina) (HASHIMOTO et al 1988; KAWAY; AKIRA 2010).

Os TLRs quando estimulados por seus ligantes desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular mediada principalmente por duas moléculas adaptadoras: a MyD88 (do inglês "*myeloid differentiation fator 88*"), molécula adaptadora de todos os

TLRs, exceto TLR-3, e a TRIF (do inglês “*TIR domain-containing adaptor inducing interferon*”), molécula adaptadora do TLR-4 e TLR-3. Isso resulta na translocação de fatores nucleares, como por exemplo NF- κ B, IRFs, AP-1, os quais são responsáveis pelo aumento da transcrição de genes que codificam diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, assim como moléculas de adesão (CREAGH, O'NEILL, 2006; IIMURO; FUJIMOTO, 2010; PICARD et al., 2010) (figura 2). A MyD88 é uma proteína adaptadora indispensável nas vias de transdução intracelular por TLR4 (LIN et al., 2015). Esta molécula tem um papel significativo para o início do processo inflamatório (WU et al., 2013).

Figura 2: Representação esquemática da via de sinalização dos TLRs



TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 utilizando a molécula adaptadora MyD88; TLR4 utilizando MyD88 ou TRIF e TLR3 – TRIF (PICARD et al., 2010).

Atualmente, já foram identificados 13 tipos de TLRs, TLR1-TLR9 presentes tanto em humanos quanto em camundongos, o TLR10, um *Toll* humano não estudado e não funcional em camundongos e os TLR11-TLR13 presentes apenas em camundongos (KAWAY; AKIRA, 2010; FERRAZ et al., 2011; PANDEY et al., 2015).

padrões moleculares associados ao dano tecidual e necrose (DAMPs – do inglês “*dangers-associated molecular patterns*”), como por exemplo proteínas de choque térmico (HSP – do inglês “*heat shock protein*”), produtos da matriz extracelular heme e proteínas de alta mobilidade BOX 1 - HMGB-1 entre outros (KUMAR et al., 2011; TANG et al., 2012), (quadro 1).

Os DAMPs são associados à inflamação estéril e à doenças como aterosclerose, Alzheimer, Parkinson e gota (FELDMAN et al., 2015). Adicionalmente, os receptores TLRs podem estar envolvidos em processos inflamatórios após o envenenamento ofídico pelo reconhecimento de DAMPs que são liberados após a mionecrose ou degradação da matriz extracelular (PAIVA-OLIVEIRA et al., 2012). Esse reconhecimento levaria ao aumento do íon cálcio intracelularmente o que contribuiria ainda mais para os danos ao tecido atingido (CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2010), caracterizando possíveis alvos a serem investigados no auxílio ao bloqueio de danos locais causados por essas peçonhas.

Os TLRs de membrana de superfície são geralmente associados à capacidade de reconhecer lipídeos, lipoproteínas e proteínas associadas aos patógenos, enquanto os endossomais, detectam ácidos nucleicos - DNA e RNA de organismos patogênicos, além de ácidos nucleicos do hospedeiro, estando envolvidos em doenças autoimunes (KAWAI; AKIRA, 2010; OLDENBURG et al., 2012; KOBLANSKY et al., 2013; PANDEY et al., 2015; CAVALCANTE et al., 2016).

O TLR2 é um receptor de membrana celular capaz de identificar vírus, fungos, bactérias e protozoários (KUMAR et al., 2011). Detectam componentes de bactérias, como lipoproteínas, peptidoglicanos (SCHWANDNER et al., 1999; UNDERHILL et al., 1999; KAWAI; AKIRA, 2010; PANDEY et al., 2015) e componentes de micobactérias (UNDERHILL et al., 1999). Também formam ancoras com glicosilfosfatidilinositol – GPI, que reconhecem espécies de *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Plasmodium falciparum* (FERRAZ et al., 2011; KUMAR et al., 2011; PICKA, 2011) e são responsáveis por desencadear a produção de IFN tipo I em resposta ao vírus vaccinia por meio de células inflamatórias mononucleadas (BARBALAT et al. 2009; PANDEY et al., 2015). Adicionalmente, esses receptores podem formar heterodímeros com TLR1 e TLR6, que atuam no reconhecimento de lipoproteínas e produção de citocinas pró-inflamatórias (KUMAR et al., 2011; PANDEY et al., 2015) ou ainda com TLR4 no reconhecimento de protozoários (KUMAR et al., 2011), além de recentemente ter sido

demonstrado que o TLR2 é ativado por PLA₂ secretada de serpente do gênero *Bothrops* (LEIGUEZ et al., 2014).

O TLR4 foi originalmente identificado por reconhecer LPS de bactérias gram-negativas (KACZOROWSKI et al., 2009). Atualmente, tais receptores são amplamente estudados como reconhecedores de estruturas fúngicas e micobacterianas (FERRAZ, et al., 2011). Além de reconhecer esses patógenos, detectam substâncias endógenas liberadas de tecidos danificados ou isquêmicos (KACZOROWSKI et al., 2009), como mRNA (ISHII, et al., 2005) se mostrando envolvidos na neuroinflamação da doença de Alzheimer (WALTER et al., 2007). Também há evidências de que esses receptores estão relacionados a resistência à insulina e sarcopenia (perda de massa muscular) do envelhecimento, se mostrando significativamente aumentados em pessoas idosas (GHOSH, 20015).

Estudos recentes sugerem que o TLR4 desempenhe um papel central como mediador de disfunção cardíaca no processo de sepse, sendo o protagonista principal da lesão, inflamação e no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (KACZOROWSKI et al., 2009). Ainda, foi demonstrado a importância desse TLR na modulação da resposta inflamatória após envenenamento ofídico por *Bothrops jararacussu* (PAIVA-OLIVEIRA et al., 2012).

O TLR5 é um receptor que reconhece flagelina, uma proteína de flagelos de bactérias (AKIRA; TAKEDA, 2004; AKIRA et al., 2006; FERRAZ et al., 2011). O seu domínio externo possui repetições ricas em leucina, onde ocorre o reconhecimento da flagelina, enquanto a parte citosólica, *Tol/IL-1*, transmite o sinal para a célula (BELL et al., 2003; MIZEL et al., 2006; YON et al., 2012; LEIFER et al., 2014). Esse TLR tem um papel na regulação da flora intestinal, sendo que a sua falta pode resultar em inflamação intestinal, tal como colite (LEIFER et al; 2014). Havendo ainda indícios de que reconheça ligantes endógenos (CHAMBERLAIN et al., 2012; KIM et al., 2013; KASSEM et al, 2015), uma vez que esse receptor está envolvido no reconhecimento e em processos inflamatórios desenvolvidos após a indução por flagelina de bactérias gram-positivas, gram-negativas e seus derivados (HAIASHI et al., 2001).

Diferentemente dos demais TLRs aqui estudados, o TLR9 é um receptor do tipo *Toll* intracelular, situado em endossomas que reconhece DNA bacteriano e viral (HEMMI et al., 2000; KRIEG et al., 1995;). Ele também é responsável pela detecção de DNA não metilado (citosina-fosforotioato-guanina - CpG), sugerindo o seu envolvimento nas doenças autoimunes (GOECKERITZ et al., 1999;). Estudo recente

indica que o TLR9 pode estar envolvido na patogênese da miastenia grave, desencadeada após a indução pelo vírus Epstein-Barr (CAVALCANTE et al., 2016).

Quadro 1: Receptores TLR e seus ligantes PAMPs e DAMPs

TLR	DAMP	PAMP
TLR1	?	Triacil lipoproteínas (bactérias)
TLR2	Proteína de choque térmico - HSP Proteínas - HMGB1	Peptidoglicano Lipoproteína Ácido lipoteicóico Zymosan RNA -Viral
TLR3	?	RNA - viral
TLR4	HSP Fibrinogênio Fibronectina	Lipopolissacarídeos
TLR5	?	Flagelina
TLR6	?	Ácido Lipoteicóico
TLR7	?	RNA -Viral
TLR8	?	RNA- Viral
TLR9	DNA não metilado	DNA- Bacteriano e viral
TLR10	?	?
TLR11	?	Profilina Flagelina
TLR12	?	Profilina
TLR13	?	23s rRNA

Adaptado de GUDKOV (2012); PANDEY (2015).

Em estudo desenvolvido por HENRIQUES-PONS et al. (2014), verificaram a expressão dos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9 em células isoladas do músculo sóleo, diafragma e músculo gastrocnêmio de camundongos com deficiência de disferina, uma proteína cuja falta provoca distrofia muscular. Neste estudo, os autores mostraram que TLR9, TLR2, TLR8 e TLR4 foram respectivamente expressos em maior porcentagem no músculo gastrocnêmio em relação aos outros TLR, estudos anteriores, já haviam verificado que os TLR2 e TLR4 são expressos em

células do tecido muscular esquelético (FROST et al., 2002; FROST et al., 2006; FRISARD et al., 2010; RAWAT et al., 2010) o que demonstra a importância da expressão desses TLR não só em leucócitos, como também em células musculares esqueléticas uma vez que esses receptores estão envolvidos na liberação de citocinas e, conseqüentemente, em diversos processos de degeneração e regeneração dos tecidos musculares. Dessa forma, o estudo dos TLRs pode trazer inúmeros benefícios no controle de doenças inflamatórias, além de serem expressos em células musculares, os receptores TLR são conhecidamente expressos em leucócitos como macrófagos e neutrófilos, esses últimos são a primeira linha de defesa mediante um dano ao organismo, seja ela de origem microbiana ou estéril, atuando nas primeiras horas após a lesão. Podem agir de forma efetora: fagocitando, liberando grânulos, espécies reativas de oxigênio (ROS) e mediando a liberação de citocinas inflamatórias, além de expressarem uma gama de receptores diferentes modulados por mediadores inflamatórios (OLIVEIRA et al., 2016).

Os neutrófilos são recrutados dos capilares sanguíneos para o sítio da infecção após receberem sinais que são gerados a partir de células danificadas e necróticas. Dentre esses sinais podemos destacar o DNA, proteínas HMGB1, componentes da matriz extracelular, peptídeos, ATP e ácido úrico, os quais podem ser detectados pelos TLR (CORDEIRO; JACINTO, 2013; PITTMAN; KUBES, 2013; BROGGI; GRANUCCI, 2015; OLIVEIRA et al., 2016), mas também podem receber outros sinais como os quimiotáticos gerados a partir de monócitos residentes e/ou células endoteliais, levando ao seu extravasamento para o sítio da injúria. Os sinais recebidos pelos TLR atuam ativando a produção de citocinas e quimiocinas (OLIVEIRA et al., 2016) que vão mediar processos inflamatórios.

1.2 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

As citocinas são proteínas produzidas por diversos tipos celulares, além de macrófagos e neutrófilos e podem agir de forma autócrina atuando na mesma célula em que foi produzida, parácrina agindo em células vizinhas ou endócrina funcionando como hormônios com efeitos a longa distância (ROITT; DELVES, 2001).

Uma citocina importante em processos inflamatórios é o fator de necrose tumoral (TNF). Essa citocina é amplamente estudada por sua ação antitumoral, causando a lise celular em linhagens neoplásicas, além de ser o principal mediador da caquexia neoplásica (perda precoce de proteína muscular). O TNF- α também é

responsável por iniciar processos de morte celular por apoptose, devido ao seu potencial em ativar caspases efetoras (CARSWELL et al., 1975; SHARMA; ANKER, 2002). Ativa leucócitos induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e hidrogênio contra organismos invasores (LIEW et al., 1990; MEGYER et al., 1995). Acelera de forma indireta a proteólise muscular (GOODMAN, 1991) e estimula a produção de IL-1 β .

A maioria das células possuem receptores para o TNF (TNFR1 e TNFR2) e dependendo da via ativada, o TNF pode desempenhar funções inflamatórias e citotóxicas (TNFR1) ou estar envolvido na proliferação celular para a regeneração tecidual (TNFR2) (CHEN; THEO et al., 2013). Após uma lesão, macrófagos residentes liberam citocinas como TNF- α e IL-1 β que ativam as células do endotélio, estimulando a produção de quimiocinas, as quais induzem a expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular tipo 1) e de VCAM-1 (molécula de adesão vascular tipo 1) contribuindo para a ativação e a migração dos neutrófilos através dos tecidos endoteliais para o sítio da injúria (D'ALESSIO et al., 1998; ABBAS et al., 2015), fenômeno de fundamental importância para a inflamação e regeneração dos tecidos necróticos (CHAVES et al., 2005).

A IL-1 β , por sua vez, é secretada na forma inativa como pró-IL-1 β e necessita ser clivada pela enzima caspase-1 para se tornar ativa. Quando madura, a IL-1 β , induz a ativação da ciclooxigenase-2, e consequentemente induz a produção de PGE₂ (sistemicamente). Além disso, essa citocina induz a produção de óxido nítrico e induz a expressão de moléculas de adesão mediando assim processos inflamatórios. A IL-1 β também está envolvida nos sintomas clínicos da dor pós cirúrgica (RAEBURN et al., 2002; RAUPACH; et al. 2006; ZANG; AN, 2007; WOLF; et al. 2008; MARCHAND; et al. 2005; OLIVEIRA; et al. 2011).

A literatura mostra que o envenenamento por serpentes *Bothrops* leva a um quadro típico de inflamação aguda que ocorre com a liberação de mediadores inflamatórios que induzem o recrutamento de leucócitos (BARROS et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2009; WANDERLEY et al., 2014). Dentre os mediadores destacam-se as citocinas (FEGHALI; WRIGHT, 1997) que tem a função de sinalização celular.

As principais citocinas estudadas após indução por peçonha ou PLA₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops* são a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (LOMONTE et al., 1993; BARROS et al., 1998; ZAMUNER et al., 2001, 2005; TEIXEIRA et al., 2009;

WANDERLEY et al., 2014), pois as mesmas medeiam processos inflamatórios importantes na imunidade inata (CRUVINEL et al., 2010).

Dados recentes da literatura mostram que células de músculo esquelético expressam TLRs que respondem a potenciais ligantes PAMPs ou DAMPs responsáveis por desencadear cascatas de fosforilação que ativam os fatores de transcrição resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, iniciando as respostas inflamatórias no tecido muscular (KASSEM et al., 2015).

Em estudo realizado por Oliveira (2011), utilizando um modelo de lesão do músculo gastrocnêmio induzida pela peçonha de *B. Jararacussu*, observou-se que camundongos deficientes para TLR4 apresentaram inicialmente aumento do edema e diminuição de migração de macrófagos para a região. Posteriormente, houve um aumento de metaloproteinase- 2 e 9 e aumento de depósito de colágeno resultando num comprometimento do reparo celular após envenenamento. Esses dados sugerem que os TLRs podem ser importantes para a modulação da resposta inflamatória e consecutiva regeneração dos tecidos (PANDEY et al., 2015; OLIVEIRA, 2011).

1.3 JUSTIFICATIVA

Os TLRs são receptores bem estudados na ativação e modulação de processos inflamatórios induzidos por PAMPs e DAMPs, porém, pouco se sabe sobre esses receptores ao se tratar de sua ativação por PLA₂ secretadas da peçonha de serpentes ou por ligantes endógenos oriundos de envenenamento. Assim, diante da ineficiência dos soros antiofídicos no bloqueio dos danos locais e levando-se em conta a participação desses receptores em diversos processos inflamatórios, faz-se necessário compreender melhor a ativação dos TLRs após o envenenamento ofídico, para que num futuro próximo possa contribuir para a eficiência da terapia quanto aos efeitos locais do envenenamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A proposta deste trabalho foi estudar a participação de diferentes TLRs durante o processo inflamatório local induzido pela peçonha e por duas PLA₂ isoladas da peçonha da serpente *B. jararacussu*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade miotóxica da peçonha de *Bothrops jararacussu* (BjussuV) e de duas PLA₂ (BthTX-I e BthTX-II) por meio de estudos histológicos e análise dos níveis de creatina quinase.
- Verificar o aumento da expressão dos TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 na lesão do músculo gastrocnêmio, induzida pelo *B. jararacussu* e pelas BthTX-I e BthTX-II;
- Avaliar a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α relacionadas com a ativação dos TLRs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PEÇONHA E TOXINAS

A peçonha de serpente *Bothrops jararacussu* (BjussuV) foi fornecida pelo Serpentário Proteínas Bioativas (Batatais - SP) e mantida sob refrigeração (8 °C) no Banco de Venenos da Amazônia no Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio-UNIR-FIOCRUZ-RO (autorização: CGEN/CNPq 010627/2011-1 e IBAMA 27131-1). As PLA₂ (BthTX-I e BthTX-II) foram isoladas da peçonha desta serpente, purificadas e, gentilmente, cedidas pelo Dr. Andreimar Martins Soares do CEBio da Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (FIOCRUZ-RO).

3.2 DOSAGEM PROTEICA

A dosagem de proteínas do BjussuV, BthTX-I e BthTX-II foi realizada por meio de teste colorimétrico com o Kit *BCA Protein Assay* (*Thermo scientific*) de acordo com instruções do fabricante. Para a realização do ensaio foram misturadas 50 partes do reagente A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinchoninico e tartarato de sódio em 0.1M de hidróxido de sódio) para 1 parte do reagente B (sulfato cúprico). Em seguida, em uma microplaca, foram adicionados 25 µL das amostras filtradas em membrana de PVDF de 0,22 µm (Millipore, Brasil) e 200 µL do reagente de trabalho (A+B), misturando por 30 segundos, a placa foi incubada a 37 °C por 30 minutos e a absorbância medida em espectrofotômetro a 562 nm. A concentração de proteínas foi determinada pela comparação da densidade óptica – DO (562nm) das amostras com a de uma curva construída utilizando BSA como padrão e os resultados foram expressos em mg/mL.

3.3 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS

Após a dosagem de proteínas, amostras da peçonha e das toxinas isoladas foram separadas e submetidas a dosagem de endotoxina pelo método LAL-Limulus Amebocyte Lysate (TAKAYAMA et al., 1994) com o kit QCL-1000 da Lonza (licença nº 1775), seguindo especificações do fabricante. A concentração de endotoxinas foi determinada pela comparação da densidade óptica – DO (562nm) das amostras com a de uma curva construída utilizando LPS como padrão e os resultados foram dados

em EU/ μ g, uma vez que o valor significativo para endotoxinas deve ser $>0,1$, todas as amostras estavam livres de endotoxinas, sendo os resultados: BjussuV 0,015983 EU/ μ g, BthTX-I - 0,0009 EU/ μ g e BthTX-II 0,014608 EU/ μ g (anexo 1).

3.4 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss machos, de peso entre 18 e 22 gramas, fornecidos pelo Biotério da FIOCRUZ-RO. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de biotério com temperatura e luz controlados, água e alimentação *ad libitum*. Os experimentos foram realizados mediante aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ-RO, registrado sob o protocolo nº 2014/07 (anexo 2).

3.5 ENVENENAMENTO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os grupos de camundongos (18-22 g) receberam injeção intramuscular - i.m no músculo gastrocnêmio de 50 μ g de BjussuV ou de BthTX-I ou BthTX-II filtradas em membrana estéril, diluídos em 50 μ L de solução salina fisiológica estéril (s.s.f.) e, os animais controle receberam injeção intramuscular (i.m) de 50 μ L de s.s.f. Após 3 horas, as amostras de sangue foram obtidas da veia cava dos animais com o auxílio de seringas heparinizadas. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, para coleta de amostras de tecido muscular, parte dessas amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, outra parte conservada em formaldeído a 10% em PBS para posterior confecção de lâminas histológicas. O sangue foi centrifugado a 700 xg por 15 minutos em centrífuga de micro tubos (Micro Spin: MS-43), separando o plasma para posteriores análises. As amostras de músculo congeladas foram estocadas em freezer a -80°C .

3.6 ATIVIDADE MIOTÓXICA

3.6.1 Lâminas histológicas

Fragmentos de tecido muscular coletados conforme o item 3.5, foram separados em grupos e cada um acondicionado em cassete histológico. Os cassetes contendo os tecidos foram submersos em álcool 70% por 1 hora, álcool 96% por 1 hora, álcool absoluto por 1 hora, xilol por 1 hora, seguido de nova imersão em xilol por mais 1 hora, adicionados em parafina líquida e acondicionados na estufa a 60°C por 1 hora. Os blocos foram concluídos com o auxílio de um dispensador de parafina. Os

blocos foram cortados com um micrótomo (2,5 μ M), as fatias colocadas em banho-Maria e posteriormente adicionadas às lâminas. As lâminas foram levadas a estufa a temperatura de 65 °C a 70 °C por 1 hora e 30 minutos.

Após esse tempo, as lâminas foram coradas, de acordo com os seguintes passos: 5 minutos em álcool absoluto, 5 minutos em água, 10 minutos em hematoxilina de Harris, duas imersões de 5 minutos em água, 1 minuto em eosina, seis lavagens em álcool absoluto, 2 banhos de 1 minuto cada em xilol para retirar os resíduos do álcool. As lâminas foram embalsamadas com bálsamo do Canadá, cobertas com lamínula de vidro e analisadas às cegas por uma patologista com o auxílio do microscópio de luz. Os achados histológicos foram classificados em níveis de 1 a 3 de acordo com a intensidade sobre a área observada, sendo: 1 (+) discreto, 2 (++) moderado e 3 (+++) intenso (quadro 2).

3.6.2 Níveis plasmáticos de creatina quinase

O plasma coletado conforme o item 3.5, foi utilizado para a avaliação da atividade miotóxica por meio da determinação da concentração da creatina quinase (CK) plasmático. A quantidade de CK-total foi avaliada utilizando método cinético UV, com kit CK-NAC Liquiform da Labtest (REF 117-1/60) de acordo com especificações do fabricante. Resumidamente, amostras de 5 μ L de plasma foram adicionadas a uma microplaca UV, juntamente com 250 μ L de reagente de trabalho e, incubadas a 37 °C por 2 minutos. Em seguida foram realizadas duas leituras, com intervalo de 2 minutos, utilizando um espectrofotômetro a 340 nm. Os níveis de CK foram determinados pela comparação da densidade óptica – DO (340nm) das amostras com a de uma curva construída utilizando padrão de CK fornecido pelo fabricante. Os resultados foram expressos em U/L.

3.7 HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS

Amostras de músculo coletadas conforme item 3.5, foram pesadas e homogeneizadas em 1 mL de s.s.f. Para isso, foi utilizado um homogeneizador de tecidos (IKA-T10 ULTRA-TURRAX) por 2 minutos na velocidade 5 (20.500 RPM). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 700 xg por 10 minutos em centrífuga de micro tubos (Micro Spin: MS-43) e, o sobrenadante coletado para dosagem de citocinas.

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Tecidos musculares com cerca de 50 a 100 mg coletados conforme o item 3.5 foram transferidos para tubos contendo 1 ml de TRIzol® (Invitrogen) gelado, em seguida triturados com homogeneizador de tecidos (T10 *basic* ULTRA-TURRAX - IKA) por dois minutos na velocidade 5 (20.500 RPM). Para garantir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas, o homogenato foi deixado em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida incubado por 3 minutos com clorofórmio e centrifugado a 12000 xg por 15 minutos a uma temperatura de 4 ° C em centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Após a centrifugação, a mistura ficou separada em fases, a parte aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo. Para promover a precipitação do RNA foi adicionado 500 µL de isopropanol, incubado em temperatura ambiente e centrifugado por 12000 xg a 8 ° C. Posteriormente, os tubos foram entornados sobre um papel absorvente para remover o sobrenadante e o RNA centrifugado com etanol (75%) a 10.500 xg por 5 minutos, a 8 ° C. A lavagem com etanol foi repetida por mais uma vez e o centrifugado foi ressuscitado em 50 µL de água DEPC - água ultrapura livre de DNase e RNase, tratada com 0,01 % de dietilpírcarbonato, estéril e filtrada (Invitrogen). Para dissolver o centrifugado e neutralizar as RNases, o material foi incubado por 10 minutos a 55 ° C. A concentração de RNA foi medida em µg/ml com o auxílio do aparelho NanoVue-Plus (GE). O material foi mantido congelado a -80 ° C para posterior síntese de DNA complementar (a metodologia foi realizada de acordo com protocolo cedido pela UNIFESP: DN:004 - Extração do RNA total).

3.9 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

Primeiramente realizou-se a eliminação do DNA contaminante, para isso foi preparada uma solução de RNA a uma concentração de 3 µg (extraídas conforme o item 3.8), água DEPC (Invitrogen), 10 x Reaction Buffer e RQ1 RNase-free DNase (1 U/µL), que se trata de uma DNase livre de RNase. Essa solução foi incubada a 37 ° C por 15 minutos. Em seguida efetuou-se a inibição da DNase e a linearização das cadeias de RNA com a adição de 2µL de Oligo (dT) primer (0,1 µg/µL), aquecimento a 65 ° C por 10 minutos e posterior resfriamento em gelo. Para a síntese de DNA complementar, preparou-se uma solução de BSA (Acetilada 20 µg/ml), 10 µL M.MLV RT 5 x Reaction Buffer – Promega (REF M531A), 10 µL de deoxynucleotideo trifosfato (dNTP) a 10 mM e 2 µL de M.MLV Reverse Transcriptase – Promega (REF M1701).

Essa solução foi adicionada ao tubo contendo RNA, incubada por 1 hora a 37 ° C, mais 10 minutos a 65 °C e resfriada em gelo. O cDNA foi estocado a – 80 ° C (a metodologia foi realizada de acordo com protocolo cedido pela UNIFESP: DN:007 – Síntese do DNA complementar com eliminação do DNA contaminante).

3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR EM TEMPO REAL

Após a extração do RNA dos tecidos, e consecutiva produção do DNA complementar, as amostras seguiram para a amplificação pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) em triplicata. Em fluxo escuro, foi preparada uma solução contendo 3,5 µL de água DEPC (Invitrogen), 5,0 µL de Master Mix Universal PCR –TaqMan (ref. 4304437) que consiste em mistura composta de oligonucleotídeos, tampão e enzima DNAPolimerase; 0,5 µL de primer TaqMan TLR2 ou TLR4, ou TLR5, ou TLR9 ou normalizador HPRT (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase). Em seguida foi adicionado 9 µL dessa solução e mais 1 µL de cDNA em cada poço. A amplificação foi realizada em aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) seguindo instruções do fabricante do kit Master Mix Universal PCR –TaqMan (ref. 4304437).

3.11 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas IL-1 β e TNF- α foram dosadas no plasma e no homogenato do músculo gastrocnêmio (item 3.7) dos animais inoculados de acordo com o item 3.5. A dosagem das citocinas foi determinada por meio de teste imunoenzimático -ELISA. Para isso foi utilizado o Kit BD OptEIA de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o anticorpo de captura foi adicionado às microplacas e incubados por uma noite (*overnight*), para serem adsorvidos. No dia seguinte, as placas foram lavadas com o tampão de lavagem fornecido pelo kit (PBS+Tween), em seguida as placas foram incubadas com Assay diluente, com a função de bloquear os sítios inespecíficos. Após 1 hora foram lavadas novamente e incubadas com as amostras por 2 horas. Após lavagem foi adicionado o anticorpo de detecção, passando por outra lavagem e adição da enzima streptavidina-HRP conjugada, seguida de lavagem e incubação com substrato por 30 minutos, por último foi adicionada a solução stop. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com os filtros de 450 nm e 570 nm e os resultados expressos em pg/mL ou pg/mg.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0, aplicando-se análise de variância ANOVA (one-way) com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas por teste de Tukey. Os dados foram expresso em média \pm erro padrão das médias (S.E.M).

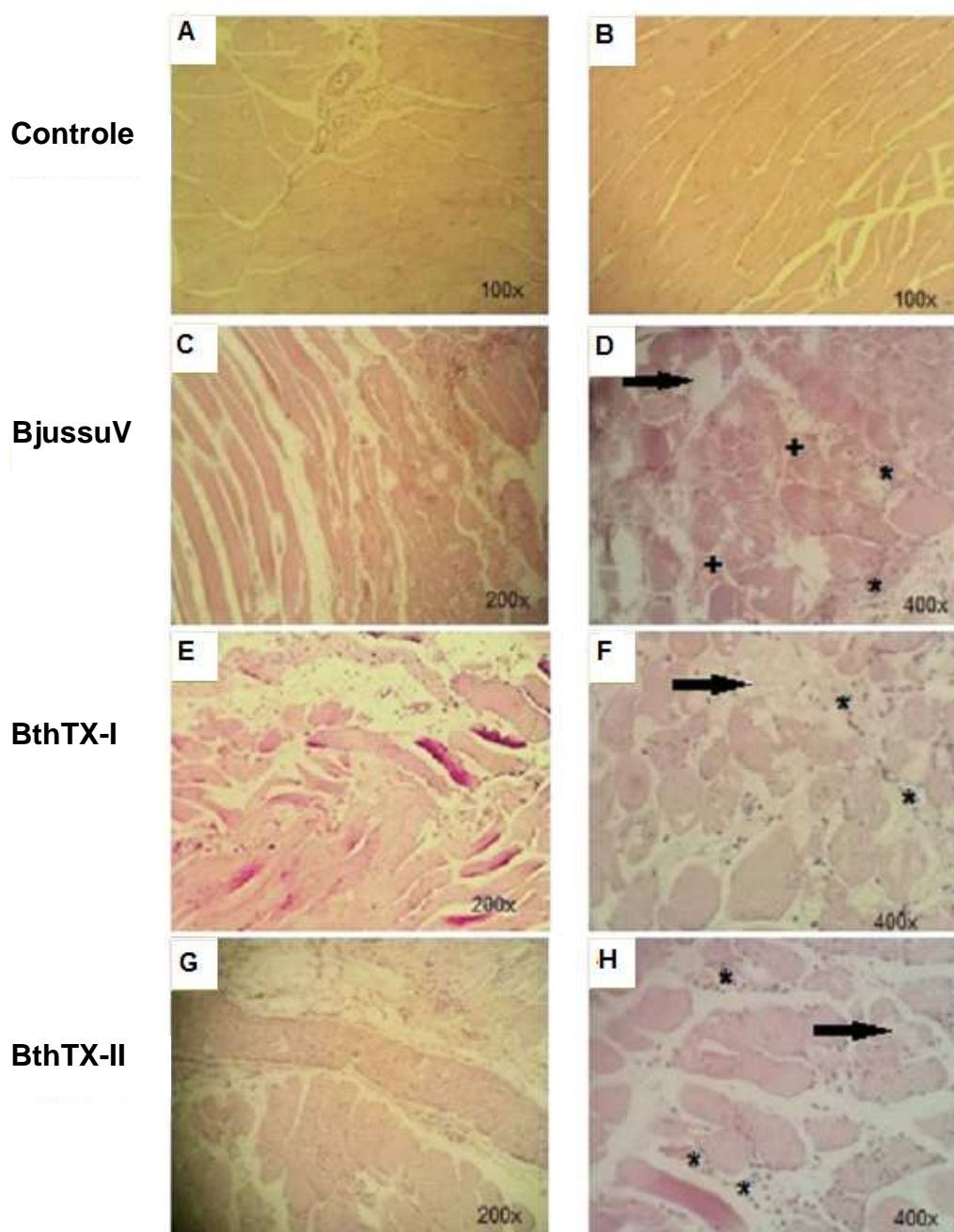
4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE MIOTÓXICA

4.1.1 *Análise histológica*

O BjussuV e as BthTX-I e BthTX-II apresentaram atividade miotóxica e inflamatória. Com o objetivo de verificar a inflamação local e a mionecrose decorrentes do envenenamento ofídico, os músculos gastrocnêmios dos camundongos, coletados após 3 horas da indução com BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou s.s.f. foram submetidos a análise histológica. Nos grupos controle não tratado (figura 4 A/ quadro 2) e s.s.f. (figura 4 B/ quadro2), pode-se observar que as fibras musculares, vasos e nervos foram preservados. No entanto, nos demais grupos notou-se alterações teciduais discretas, moderadas ou intensas. De acordo com a leitura das lâminas, o grupo tratado com BjussuV apresentou extensas áreas de mionecrose, discreto infiltrado inflamatório neutrofílico e moderado extravasamento de hemácias (figura 4 C, D/ quadro 2). Já os animais que receberam injeção de BthTX-I também apresentaram extensas áreas de mionecrose e discreto infiltrado inflamatório neutrofílico, porém a hemorragia ocorreu de forma discreta, podendo ser visualizado também um edema intersticial (figura 4 E, F/ quadro 2). Os tecidos dos camundongos inoculados com BthTX-II apresentaram focos de necrose muscular, discreta inflamação neutrofílica e congestão vascular (figura 4 G, H/ quadro 2). Estes resultados são compatíveis com o aumentado índice de CK, liberado do músculo para o plasma, confirmando o efeito miotóxico, inflamatório e necrosante da peçonha de *Bothrops jararacussu* e das BthTX-I e BthTX-II.

Figura 4: Histologia de tecido muscular de camundongos



Cortes de músculo gastrocnêmio após 3 horas da injeção i.m. de 50 µg de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 µL de s.s.f. **A- Controle não tratado:** fibras musculares, vasos e nervos preservados (**A 100x**). **B- Controle salina:** fibras musculares preservadas (**B 100x**). **C e D- BjussuV:** extensas áreas de necrose das fibras musculares (→), discreto infiltrado inflamatório neutrofílico (*) e extravasamento moderado de hemácias (+) (**C 200x, D 400x**). **E e F- BthTX-I:** extensas áreas de necrose das fibras musculares (→), infiltrado neutrofílico (*), edema intersticial e discreto extravasamento de hemácias (+) (**E 200x, F 400x**). **G e H- BthTX-II:** focos de necrose muscular (→), infiltrado inflamatório neutrofílico (*) discreto e congestão vascular (**G 200x, H 400x**). Corantes: Hematoxilina e Eosina.

Quadro 2: **Qualificação dos danos causados ao tecido muscular: principais achados histológicos**

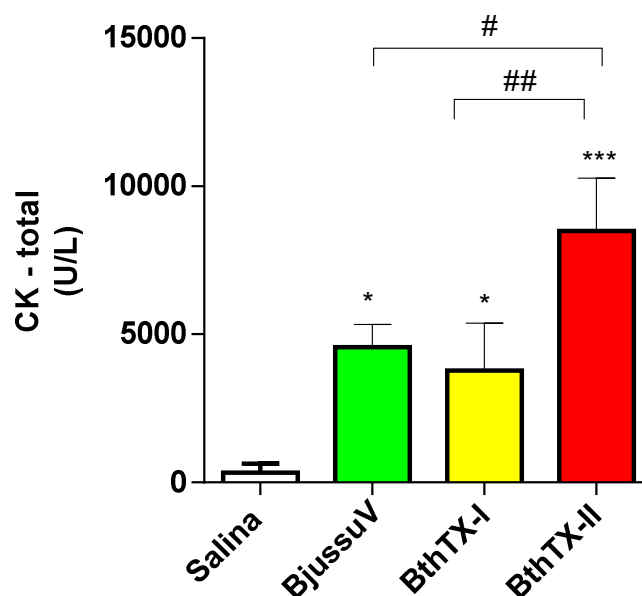
Grupo	Infiltrado neutrofílico	Necrose	Extravasamento de hemácias
Controle	-	-	-
Salina	-	-	-
BjussuV	+	+++	++
BthTX-I	+	+++	+
BthTX-II	+	++	-

(-) não induziu/ (+) discreto / (++) moderado / (+++) intenso

4.1.2 Aumento dos níveis de CK no plasma

A BthTX-II apresentou miotoxicidade mais elevada em relação aos demais tratamentos. Para quantificar a atividade miotóxica, foi dosado o nível de CK total do plasma dos grupos BjussuV / BthTX-I / BthTX-II (50 µg) ou 50 µL de s.s.f. após 3 horas da injeção. Desta forma observamos que o grupo BjussuV apresentou uma média de $4572 \pm 434,6$ U/L ($n = 3$); enquanto BthTX-I obteve média de $3786 \pm 795,7$ U/L ($n=4$) e a BthTX-II demonstrou média de 8489 ± 1027 U/L ($n=3$); contra $331,7 \pm 172,7$ U/L ($n=3$) no grupo controle. Ainda, de acordo com as análises estatísticas, observou-se que todos os grupos causaram aumento significativo de CK em relação ao controle (* $p < 0,05$). Também foi possível observar diferença entre os grupos tratados, sendo a BthTX-II mais significativa em relação a BthTX-I e BjussuV (# $p<0,05$) (Figura 5/Tabela 1).

Figura 5: Efeito miotóxico de BjussuV, BthTX-I e BthTX-II sobre camundongos Swiss



Grupos de 3-4 camundongos receberam injeção i.m de 50 µg de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou s.s.f. Após 3 horas, o plasma foi coletado e utilizado para a dosagem de CK-total. Todos os grupos tratados tiveram produção de CK significativa em relação ao controle (* $p < 0,05$). A BthTX-II induziu maior aumento em relação ao BthTX-I (# $p < 0,05$). Os valores foram expressos em média \pm SEM (ANOVA).

Tabela 1: Médias de produção de CK no plasma \pm SEM

Grupos	CK (U/L)
Salina	331,7 \pm 172,7
BjussuV	4572 \pm 434,6
BthTX-I	3786 \pm 795,7
BthTX-II	8489 \pm 1027

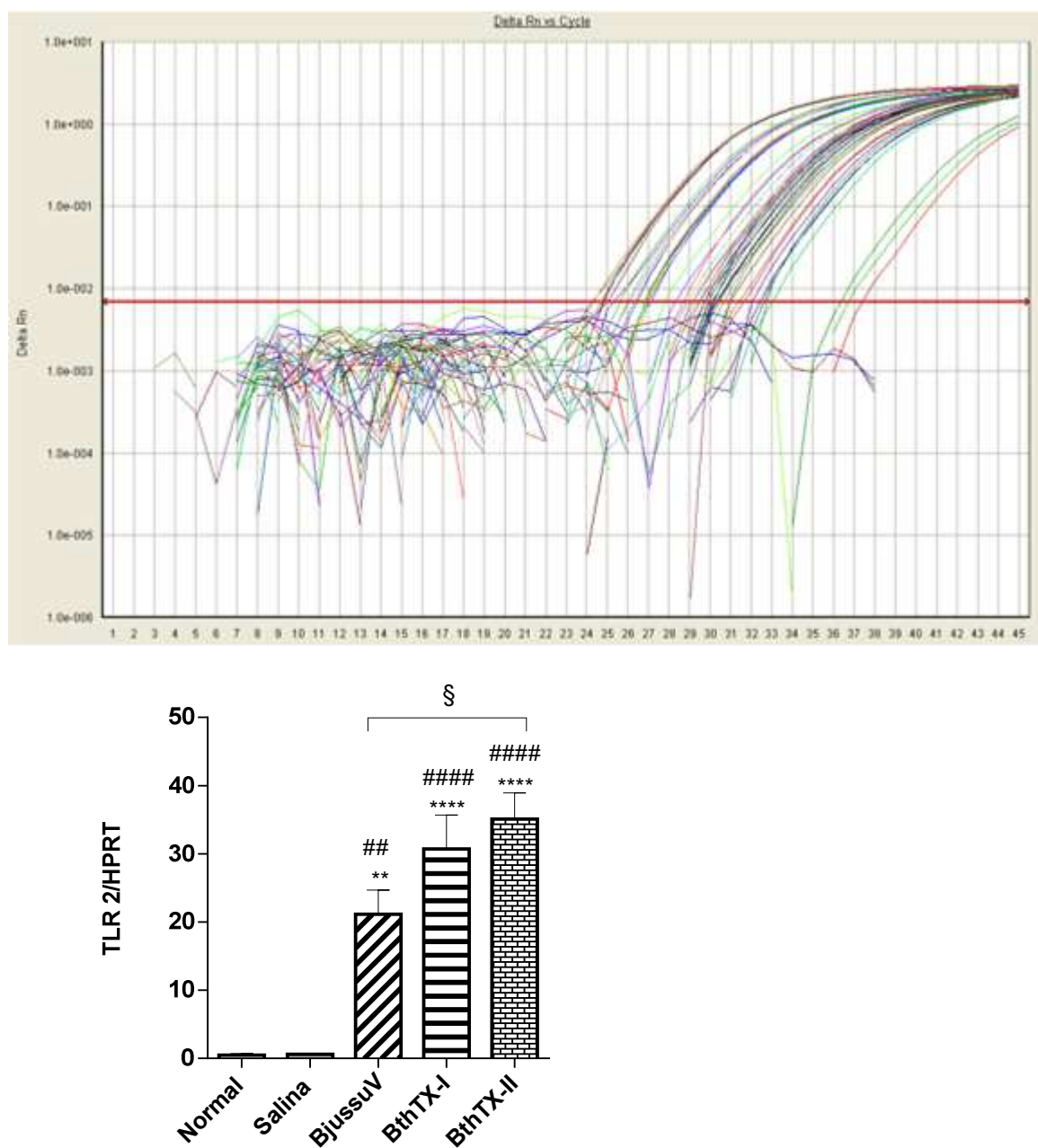
4.2 AUMENTO DA EXPRESSÃO DOS TLRs

Os tecidos coletados após 3 horas da injeção de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou salina, ou de animais não tratados foram submetidos a análise de expressão gênica. Para isso, foi necessário antes realizar a extração do RNAm e, subsequente síntese de cDNA. A expressão gênica dos TLRs foi quantificada por meio de sonda TaqMan.

4.2.1 Aumento da expressão de TLR 2

O aumento da expressão de TLR2 foi verificado após injeção da peçonha e das toxinas isoladas. Após 3 horas da injeção de 50 µg de BjussuV/ BthTX-I / BthTX-II ou 50 µL de s.s.f. coletou-se o músculo gastrocnêmio para verificação da expressão gênica de TLR. Desta forma, foi possível observar que o grupo salina obteve uma média de $0,6094 \pm 0,1130$ (n=8) não apresentando expressão significativa de TLR 2 em relação ao grupo controle não tratado $0,4794 \pm 0,1777$ (n=9). Todos os demais grupos, BjussuV $21,15 \pm 3,519$, (n=7), BthTX-I $30,71 \pm 4,958$ (n=8) e BthTX-II $35,07 \pm 3,866$ (n=9) apresentaram aumento significativo da expressão gênica de TLR2 em relação ao controle salina com * $p < 0,05$. Ainda, de acordo com as análises estatísticas, pode-se observar que todos os grupos tratados com a peçonha e as toxinas produziram maior aumento desse TLR em relação ao grupo não tratado ($\#p < 0,05$). Também foi possível verificar maior aumento induzido pelos BthTX-II em relação ao BjussuV ($\$p < 0,05$). Os valores foram expressos em média \pm SEM (Figura 6/ Tabela 2).

Figura 6: **Expressão de TLR2 em tecido muscular de camundongos**

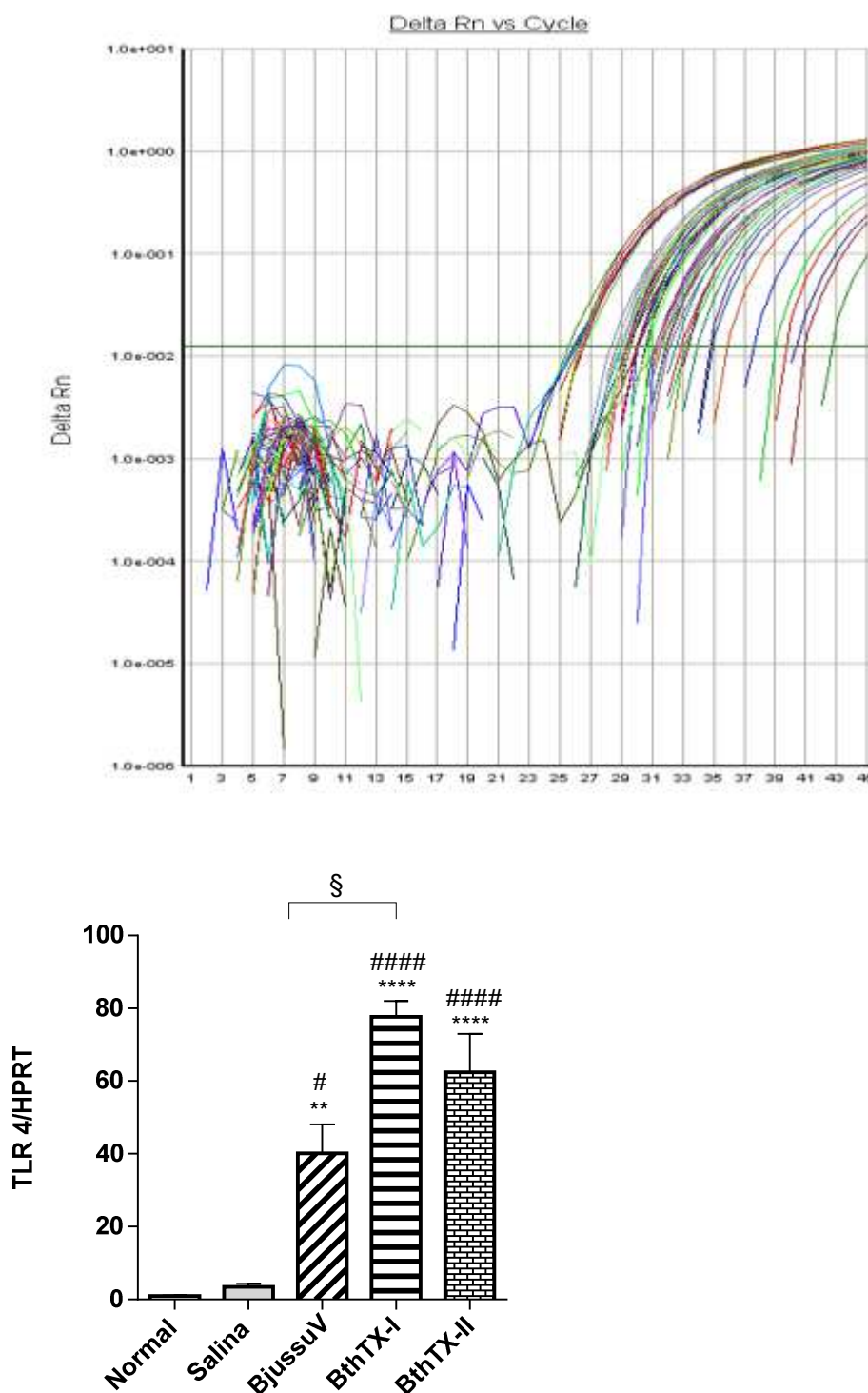


Grupos de 5-9 camundongos receberam injeção i.m de 50 µg de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 µL de s.s.f. Após 3 horas, o músculo gastrocnêmio foi coletado e utilizado para análise da expressão de TLR2. Todos os grupos apresentaram expressão significativa de TLR2 em relação ao controle salina (* $p < 0,05$) e em relação ao grupo não tratado (# $p < 0,05$). O BthTX-II apresentou expressão elevada em relação ao BjussuV (§ $p < 0,05$). Os valores foram expressos em média ± SEM (ANOVA).

4.2.2 Aumento da expressão de TLR4

Grupos de camundongos receberam injeção i.m de 50 µg de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou s.s.f. e, após 3 horas, o músculo gastrocnêmio foi coletado para análise de expressão gênica de TLR4. De acordo com os resultados, o grupo controle não tratado apresentou média $0,9197 \pm 0,1802$ (n=6), o grupo controle tratado com salina apresentou média de $3,423 \pm 0,9049$ (n=5), já os demais grupos induziram um aumento expressivo de TLR4. Podem ser observadas as seguintes médias: BjussuV $40,10 \pm 7,982$ (n=7), BthTX-I $77,66 \pm 4,388$ (n= 5) e BthTX-II $62,42 \pm 10,50$ (n=8). Assim, foi possível verificar que os grupos tratados com BjussuV, BthTX-I e BthTX-II induziram maior expressão de TLR4 quando comparados ao controle salina (*p<0,05) ou ainda em relação ao controle não tratado (#p<0,05). Também foi detectada maior aumento da expressão no grupo tratado com BthTX-II em relação ao BjussuV (§p<0,05). Os valores foram expressos em média \pm SEM. (Figura 7/Tabela 2).

Figura 7: Expressão de TLR4 em tecido muscular de camundongos

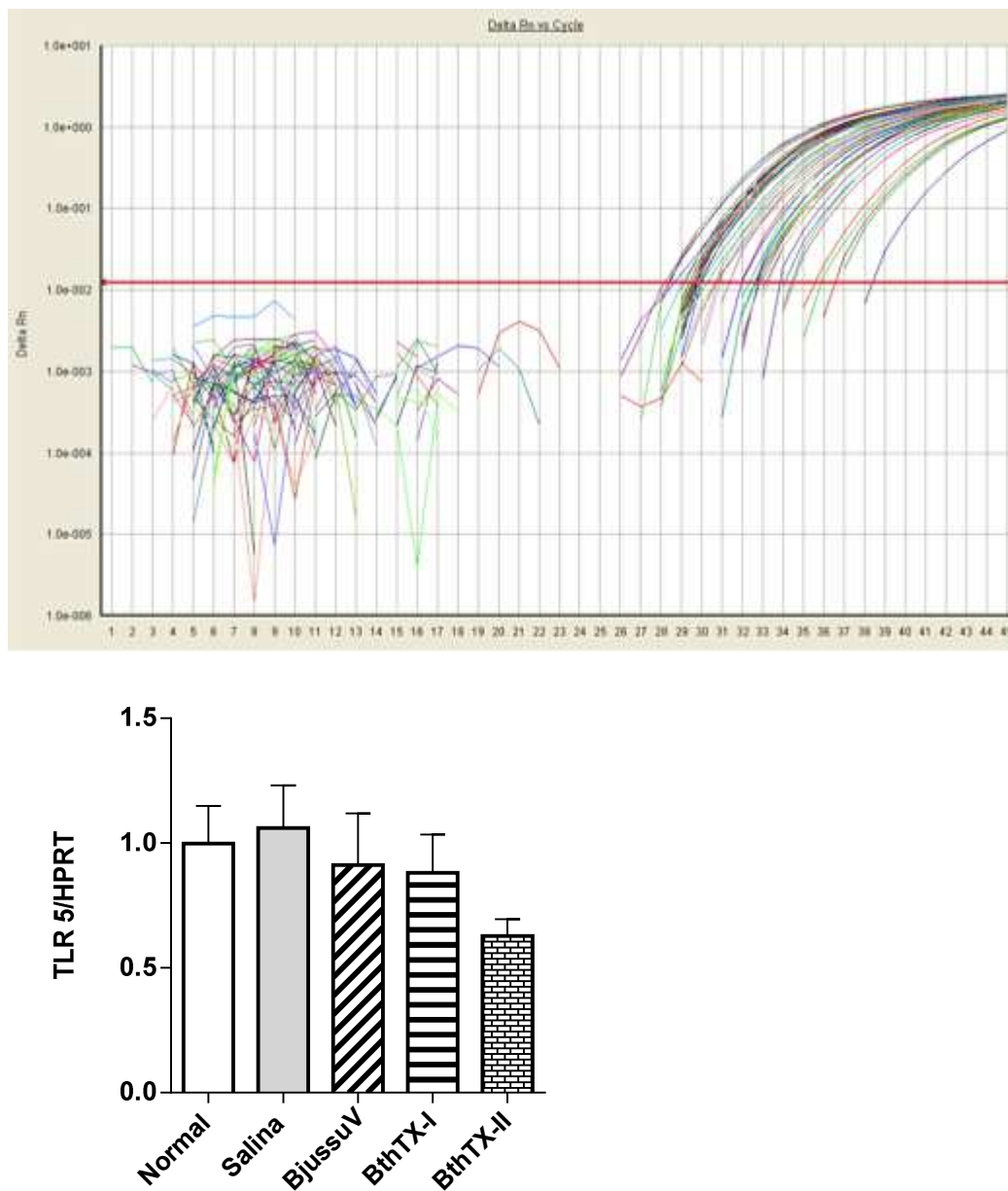


Grupos de 5-8 camundongos receberam injeção i.m de 50 µg de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 µL de s.s.f. Após 3 horas o músculo gastrocnêmio foi coletado e utilizado para análise da expressão de TLR 4. Todos os grupos apresentaram expressão significativa de TLR4 em relação ao controle salina (* $p < 0,05$) e em relação ao grupo não tratado. O BthTX-I apresentou aumento significativo em relação ao BjussuV (§ $p < 0,05$). Os valores foram expressos em média ± SEM (ANOVA).

4.2.3 Quantificação da expressão de TLR5

Após 3 horas da injeção de 50 µg de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 µL de s.s.f. o músculo gastrocnêmio foi excisado e utilizado para análise da expressão de TLR5 pelo qRT-PCR. Desta forma, observamos que quando comparados ao controle não tratado ($0,9983 \pm 0,1498$ n=4) ou ao controle salina ($1,061 \pm 0,1701$ n=4), os grupos BjussuV ($0,9120 \pm 0,2075$ n=10), BthTX-I ($0,8806 \pm 0,1535$ n=10) e BthTX-II ($0,6271 \pm 0,06671$ n=10) não apresentaram expressão significativa de TLR5 ($p>0,05$). Os grupos tratados com a peçonha e as toxinas também foram comparados entre si e não apresentaram resultados estatísticos significativos. Os valores foram expressos em média \pm SEM (Figura 8/Tabela 2).

Figura 8: **Expressão de TLR5 em tecido muscular de camundongos**

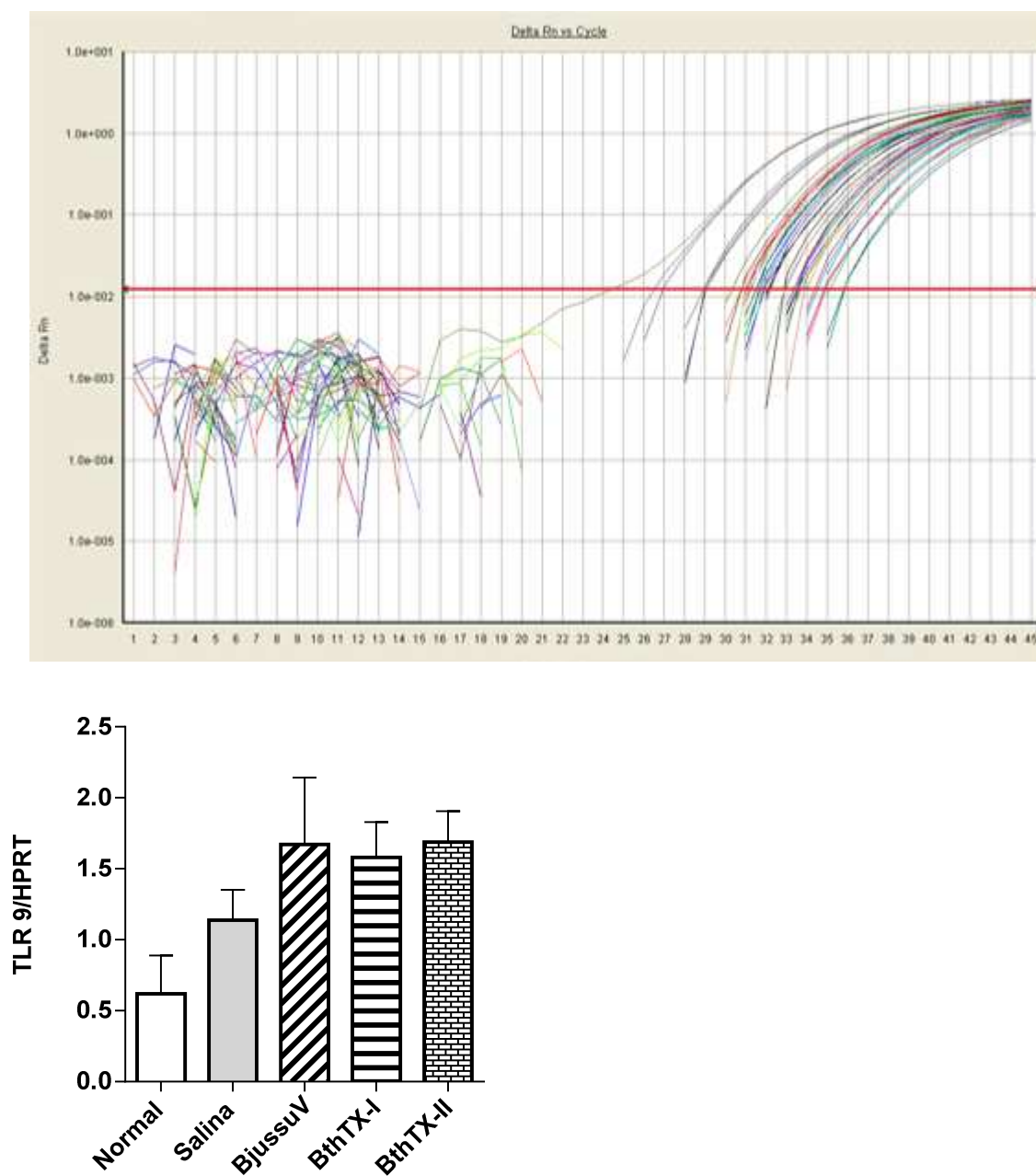


Grupos de 4-8 camundongos receberam injeção i.m de 50 μ g de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 μ L de s.s.f. Após 3 horas o músculo gastrocnêmio foi coletado e utilizado para análise da expressão de TLR 5. Não foi verificada expressão significativa de TLR5 entre os grupos tratados ou em relação aos controles. Os valores foram expressos em média \pm SEM (ANOVA).

4.2.4 Quantificação da expressão de TLR 9

Foi verificada a expressão gênica de TLR9 do músculo gastrocnêmio de camundongos após 3 horas de injeção i.m de 50 µg de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 µg de s.s.f. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que o grupo controle não tratado apresentou uma média de $0,6200 \pm 0,2695$ (n=5), o grupo controle salina obteve média $1,139 \pm 0,2123$ (n=5), BjussuV $1,673 \pm 0,4697$ (n=6), BthTX-I $1,581 \pm 0,2479$ (n=10) e o BthTX-II $1,788 \pm 0,2096$ (n=10) de expressão gênica. Desta forma, os grupos tratados com BjussuV, BthTX-I e BthTX-II não induziram expressão significativa de TLR9 quando comparados aos controles. Os grupos também foram comparados entre si e não foram detectadas diferenças significativas na expressão de TLR9 ($p > 0,05$). Os valores foram expressos em média \pm SEM (Figura 9/Tabela 2).

Figura 9: **Expressão de TLR9 em tecido muscular de camundongos**



Grupos de 4-9 camundongos receberam injeção i.m de 50 µg de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 µL de s.s.f. Após 3 horas o músculo gastrocnêmio foi coletado e utilizado para análise da expressão de TLR 9. Não foi verificada diferença de expressão significativa de TLR9 entre os grupos tratados ou em relação aos controles. Os valores foram expressos em média ± SEM (ANOVA).

Tabela 2: Médias de expressão dos TLRs \pm SEM

Grupos	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9
Normal	0,479 \pm 0,177	0,9197 \pm 0,180	0,998 \pm 0,149	0,620 \pm 0,269
Salina	0,609 \pm 0,113	3,423 \pm 0,904	1,061 \pm 0,170	1,139 \pm 0,212
BjussuV	21,15 \pm 3,514	40,10 \pm 79,82	0,912 \pm 0,207	1,673 \pm 0,469
BthTX-I	30,71 \pm 4,958	77,66 \pm 4,388	0,880 \pm 0,153	1,581 \pm 0,247
BthTX-II	35,07 \pm 3,866	62,42 \pm 10,50	0,627 \pm 0,066	1,788 \pm 0,209

4.3. PRODUÇÃO DE CITOCINAS

4.3.1 Produção de *TNF- α* no tecido muscular

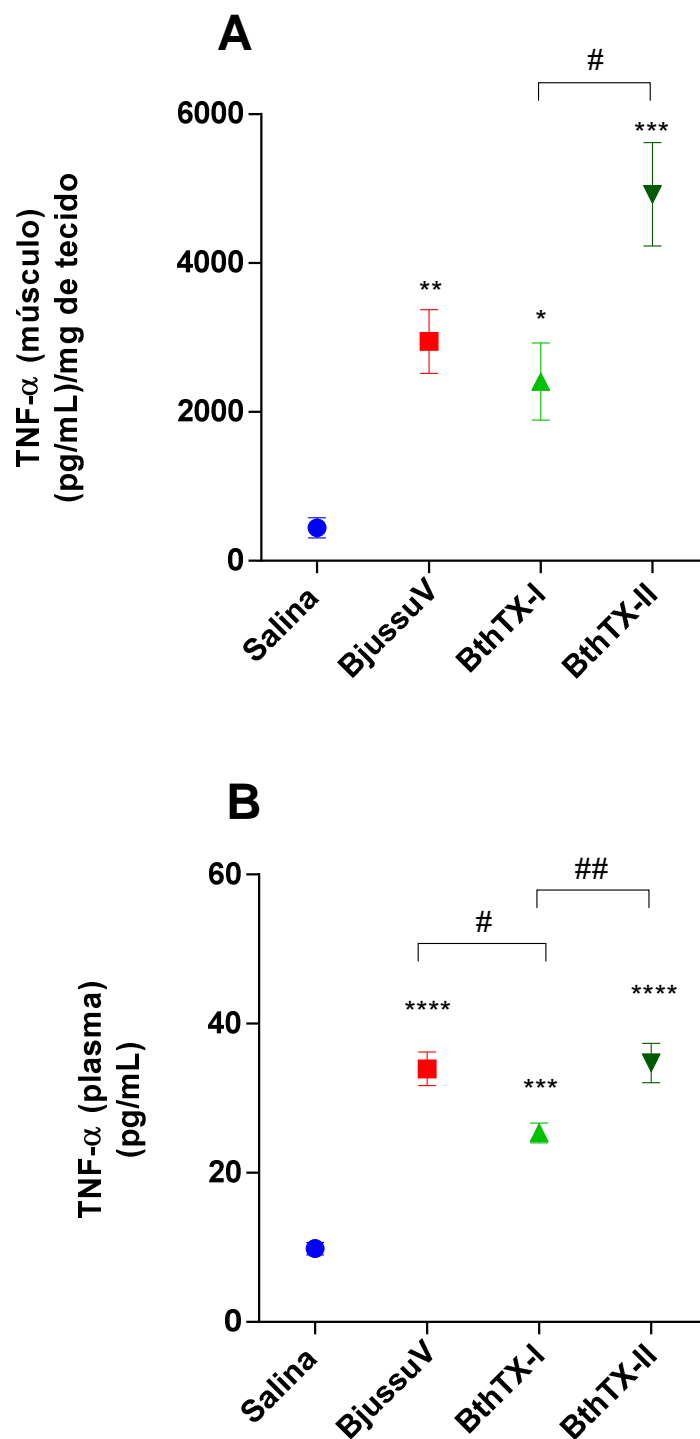
A concentração de *TNF- α* foi avaliada no homogenato do músculo gastrocnêmio obtido após 3 horas da injeção i.m. de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II (50 μ g/50 μ L s.s. f.) ou 50 μ L s.s.f. Todos os tratamentos foram significativos em relação ao controle (* $p < 0,05$), sendo BthTX-II a que induziu aumentos mais significativos de *TNF- α* , com uma média de 4922 \pm 694,7 pg/mg (n=3), comparados a 441,1 \pm 136 pg/mg no grupo controle (n=4). Observou-se ainda que os demais grupos também apresentaram valores significativos de *TNF- α* em relação ao grupo controle, apresentando uma produção média de 2945 \pm 960,8 pg/mg para o BjussuV (n=5) e 2409 \pm 520,9 pg/mg (n=4) para BthTX-I. Os grupos tratados com BjussuV, BthTX-I ou BthTX-II também foram comparados entre si. Desta forma, foi possível observar que a BthTX-II induziu aumento significativo de *TNF- α* em relação a BthTX-I (valores expressos em média \pm SEM), (figura 10A/Tabela 3).

4.3.2 Produção de *TNF- α* no plasma

A concentração de *TNF- α* foi avaliada no plasma, obtido após 3 horas da i.m. de BjussuV, BthTX-I, BthTX-II (50 μ g/50 μ L s.s.f.) ou 50 μ L s.s.f. Todas os grupos testados induziram aumento significativo de *TNF- α* , quando comparadas ao controle (* $p < 0,05$). A média de concentração dessa citocina apresentada no plasma dos grupos foi de 33,92 \pm 2,250 pg/mL para o BjussuV (n=6); 25,36 \pm 1,322 pg/mL para BthTX-I (n=8); e 34,72 \pm 2,654 pg/mL para BthTX-II (n=8), contra 9,829 \pm 0,8427 pg/mL no grupo controle (n=5). Os grupos tratados com BjussuV, BthTX-I ou BthTX-II também foram comparados entre si, podendo-se observar que o BthTX-II e o BjussuV

induziram maior aumento de TNF- α em relação ao BthTX-I, considerando #p<0,05 (valores expressos em média \pm SEM), (Figura 10B/Tabela 3).

Figura 10: **Produção de TNF- α no tecido muscular e no plasma de camundongos**



Grupos de 4-8 camundongos receberam injeção i.m de 50 μ g de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 μ L de s.s.f. Após 3 horas, o plasma e o músculo gastrocnêmio foram coletados e utilizados para a dosagem de TNF- α . Tanto no músculo (A) quanto no plasma (B) todas as toxinas testadas induziram produção significativa de TNF- α em relação ao controle * $p < 0,05$ e a BthTX-II induziu maior aumento em relação ao BthTX-I # $p < 0,05$. Os valores foram expressos em média \pm SEM (ANOVA).

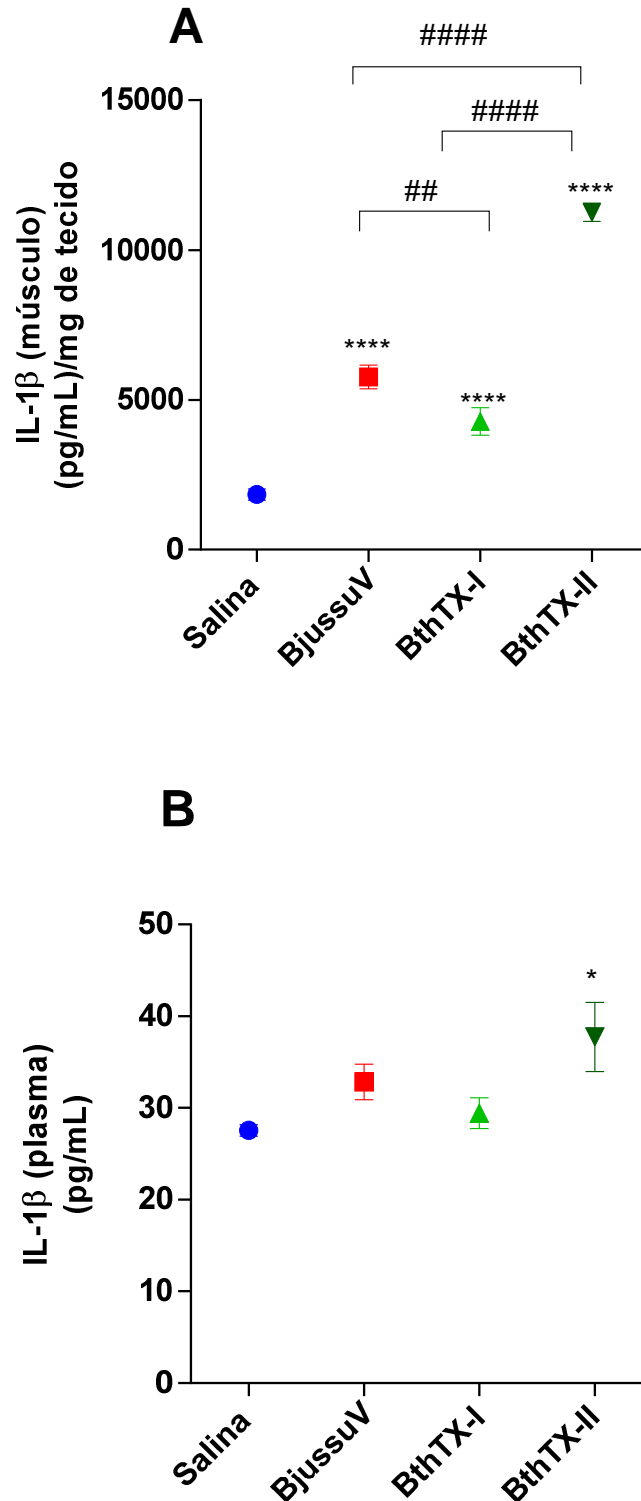
4.3.3 Produção de IL-1 β no tecido muscular

Os músculos dos grupos tratados com BjussuV, BthTX-I, BthTX-II ou s.s.f. foram homogeneizados e a concentração de IL-1 β foi detectada por ELISA. Desse modo, nesses tecidos, foram encontradas concentrações significativas dos níveis de dessa citocina quando comparados os grupos tratados com BjussuV, BthTX-I ou BthTX-II ao controle (* $p < 0,05$). Sendo que a média de produção dessa citocina foi de $5764 \pm 230,3$ pg/mg para o BjussuV ($n=3$), $4277 \pm 277,3$ pg/mg para BthTX-I ($n=4$) e $11261 \pm 174,1$ pg/mg para o grupo BthTX-II ($n=3$) contra $1836 \pm 108,7$ pg/mg do controle ($n=3$). As toxinas também foram comparadas umas às outras, assim, foram identificadas diferenças significativas entre as mesmas (# $p < 0,05$), sendo que a BthTX-II induziu maior aumento em relação a BthTX-I e ao BjussuV e, a peçonha induziu ainda maior aumento de IL-1 β quando comparado a BthTX-I (valores expressos em média \pm SEM), (Figura 11 A/Tabela 3).

4.3.4 Produção de IL-1 β no plasma

Os plasma dos grupos tratados com BjussuV, BthTX-I, BthTX-II ou s.s.f. foi utilizado para análise da concentração de IL-1 β por ELISA. Assim, verificou-se que a BthTX-II induziu produção significativa dessa citocina em relação ao controle (* $p < 0,05$). Os demais grupos também induziram aumento, porém, não significativos. O BjussuV apresentou média de $32,83 \pm 1,919$ pg/mg ($n=3$); a BthTX-I $29,45 \pm 1,664$ pg/mL ($n=5$) e a BthTX-II $37,75 \pm 3,768$ pg/mL ($n=3$), contra $27,55 \pm 6351$ pg/mL no grupo controle ($n=4$) (valores expressos em média \pm SEM), (Figura 11 B/Tabela 3).

Figura 11: Produção de IL-1 β no tecido muscular e no plasma de camundongos



Grupos de 4-8 camundongos receberam injeção i.m de 50 μ g de BjussuV / BthTX-I / BthTX-II ou 50 μ L de s.s.f. Após 3 horas, o plasma e o músculo gastrocnêmio foram coletados e utilizados para a dosagem de IL-1 β . No músculo (A) todas as toxinas testadas induziram uma produção significativa de IL-1 β em relação ao controle * p <0,05 havendo diferença entre os tratamentos # p <0,05. No plasma (B) o grupo BthTX-II apresentou produção significativa de IL-1 β em relação ao controle * p <0,05. Os valores foram expressos em média \pm SEM (ANOVA).

Tabela 3: Médias de produção de TNF- α e IL-1 β \pm SEM

Grupos	TNF- α Músculo (pg/mg)	TNF- α Plasma (pg/mL)	IL-1 β Músculo (pg/mg)	IL-1 β Plasma (pg/mL)
Salina	441,1 \pm 136	9,829 \pm 0,842	1836 \pm 108,7	27,55 \pm 6,351
BjussuV	2945 \pm 960,8	33,92 \pm 2,250	5764 \pm 230,3	32,83 \pm 1,919
BthTX-I	2409 \pm 520,9	25,36 \pm 1,322	4277 \pm 277,3	29,45 \pm 1,664
BthTX-II	4922 \pm 694,7	34,72 \pm 2,654	11261 \pm 174,1	37,75 \pm 3,768

5 DISCUSSÃO

Os TLRs são receptores que estão envolvidos na ativação e modulação de processos inflamatórios induzido tanto por PAMPs quanto por DAMPs. É conhecido que os venenos induzem um quadro local de extensa inflamação e mionecrose decorrente da ação de toxinas com estrutura de PLA₂ presentes em grandes quantidades nesses venenos ou por ligantes endógenos oriundos do envenenamento. Com base nesse conhecimento, a compreensão sobre o mecanismo de ativação dos TLRs e a participação desses receptores no envenenamento experimental é de grande relevância.

Dentre os efeitos causados pela peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*, um dos que mais se destacam é a miotoxicidade (MEBS et al., 1983; QUEIROZ et al., 1984; GUTIERREZ; LOMONTE, 1985; MILANI JÚNIOR et al., 1997; MONTEIRO-MACHADO et al., 2015), que é caracterizada por lesão do tecido muscular, ocasionada precocemente pela necrose desse tecido. Esse efeito se deve a ação de proteínas básicas miotóxicas presentes nessas peçonhas, a PLA₂ Lys-49 e a PLA₂ Asp-49. Essas miotoxinas são conhecidas por ocasionar graves lesões musculares, podendo agir por rompimento da membrana plasmática causando a hidrólise dos fosfolípidios e posterior influxo de cálcio (GUTIÉRREZ, 2016; GUTIÉRREZ et al., 1984a; GUTIÉRREZ et al., 1984b), levando a morte celular, degeneração das fibras musculares e consequente erijecimento das fibras do músculo (GUTIERREZ; OWNBY, 2003; GUTIERREZ; LOMONT, 2013; AYRES, 2015). Os danos locais descritos após o envenenamento, podem ser um resultado tanto direto da ação da peçonha e/ou toxinas quanto indireto por amplificação das respostas inflamatórias às lesões causadas pela peçonha e/ou miotoxinas (NASCIMENTO et al., WANDERLEY et al., 2014).

A miotoxicidade pode ser detectada por análise histológica e, principalmente, pela liberação da CK para a corrente sanguínea, indicando lesão sarcolemal, pois em condições normais esta enzima é encontrado no interior do músculo, ocorrendo baixa quantidade circulante (CALIL-ELIAS et al., 2002; BARBOSA et al., 2009; OLIVEIRA, 2011). Uma vez que já está bem evidenciado em outros estudos que o pico de CK no plasma ocorre aproximadamente após 3 horas de indução, os experimentos aqui

descritos foram realizados nesse período (GUTIÉRREZ, et al., 1991; SANTOS et al., 1992).

No presente estudo, foi evidenciado mediante análise histológica que o BjussuV induziu mionecrose, apresentando extensas áreas de necrose, hemorragia e presença de infiltrado neutrofílico. Além disso, por análise bioquímica, um aumento significativo dos níveis de CK plasmático foram detectados, confirmando o efeito miotóxico do BjussuV.

Corroborando com os dados presentemente obtidos, estão os de MEBS et al. (1983). Esses autores testaram a peçonha de 25 espécies de diferentes serpentes sendo a maioria delas da família Viperidae. Em seu estudo, os autores observaram por meio de lâminas histológicas que 20 dessas espécies foram capazes de induzir a mionecrose e dentre essas espécies, a *B. jararacussu* foi uma das que se mostrou miotóxica. Ainda confirmando a capacidade mionecrótica de BjussuV, outros autores observaram uma importante degeneração das fibras do músculo com áreas necróticas após 3, 4 ou 24 horas da i.m de BjussuV (CALIL-ELIAS et al., 2002; VERONESE et al., 2005; BARBOSA et al., 2009; SATURNINO-OLIVEIRA et al., 2012). Herrera et al. (2016) injetaram 50 µg de peçonha de *B. asper* em músculo gastrocnêmio de camundongos e também verificaram necrose das fibras musculares após 1h e 6h, demonstrando assim, que a mionecrose ocorre precocemente. Desta forma, a necrose verificada no presente estudo vem contribuir para a confirmação da precocidade desse processo e enriquecer os dados já existentes.

Após o dano tecidual, os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o sítio da lesão, seguido por macrófagos M1 que podem ser induzidos por TNF- α , interferon- γ ou pela interação de ligantes aos seus receptores TLR, passando a produzir citocinas como a IL-1, IL-12 e TNF- α ou espécies reativas de oxigênio, amplificando assim os danos teciduais. Em seguida, os macrófagos polarizam para o fenótipo M2 que são responsáveis pela remoção dos detritos culminando com a resolução da inflamação (GORDON, 2003; TIDBALL et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2016). Em um estudo realizado por Wanderley et al. (2014), os autores observaram a migração de neutrófilos para o local da lesão 1 hora após a inoculação de BjussuV em pata de camundongo. Os mesmos autores também demonstraram que o BjussuV é capaz de induzir a migração de neutrófilos humanos *in vitro*. Saturnino-Oliveira et al. (2012), verificaram após 2 horas da injeção de BjussuV que o número de neutrófilos contidos na corrente sanguínea diminui significativamente em relação ao controle,

indicando que essas células permearam o endotélio vascular para migrar para o sítio da lesão. Em cortes histológicos, esses autores também verificaram intenso infiltrado de células inflamatórias no tempo de 24 horas, porém não realizaram testes histológicos com menor tempo após a indução.

Em estudo realizado por Gutiérrez et al. (1986) demonstraram aumento de leucócitos após 6 horas de inoculação da peçonha de *B. asper* no músculo gastrocnêmio de camundongos. Moreira et al. (2012) também observaram migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos, após 1 e 8 horas da inoculação de peçonha de *Bothrops atrox*. Em estudo similar, Herrera et al. (2016) injetaram 50 µg de peçonha de *B. asper* em músculo gastrocnêmio de camundongos e verificaram um maior número de células inflamatórias após 6 e 24 horas, sendo que nas primeiras 6 horas predominaram células polimorfonucleares como neutrófilos e, após 24 horas, houve maior predominância de macrófagos, o que confirma os dados do presente estudo, pois foi verificado infiltrado neutrofílico nas primeiras horas após indução, corroborando com a literatura.

Quanto ao extravasamento de hemácias observado no grupo BjussuV do presente estudo, pode-se afirmar que é um evento comum ao envenenamento por serpentes *Bothrops* devido ao veneno ser uma mistura de substâncias com diferentes ações (MAGRO et al, 2004; WATANABE et al., 2005; ZULIANI et al., 2005; PANUNTO et al., 2006; ANGULO; LOMONTE, 2009; MENALDO et al, 2012; RODRIGUES, et al., 2014; ANGULO et al., 2014; SARTIM et al., 2015; ZAQUEO et al., 2016), tais como as metaloproteinases que possuem principalmente ação hemorrágica (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Ao injetar BjussuV e outras peçonhas de diversas espécies da família Viperidae na pata de camundongos ou até mesmo na pele, MEBS et al. (1983) observaram acentuada hemorragia em quase todas as peçonhas testadas. Outros autores também observaram atividade hemorrágica após indução com BjussuV (CALIL-ELIAS et al., 2002; BARBOSA et al., 2009; WANDERLEY et al., 2014). Após 1h e 6h da indução com *B. asper*, Herrera et al. (2016) verificaram um abundante número de eritrócitos em músculo gastrocnêmio de camundongos. Outros autores também haviam verificado, anteriormente, a presença de atividade hemorrágica nas peçonhas de *Bothrops* (GUTIÉRREZ et al., 1980; GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980; CHAVES et al., 2005; SILVA et al., 2016). Desta forma os resultados verificados no presente estudo corroboram com os já descritos na literatura.

Analizando cortes histológicos, Wanderley et al. (2014) também observaram o aparecimento de edema após injeção de BjussuV na pata de camundongos. Isto pode ocorrer devido ao aumento da permeabilidade vascular durante o processo inflamatório (RYAN; MAJNO, 1977; WANDERLEY et al., 2014), causado por componentes da peçonha de *Bothrops* como as fosfolipases Lys-49 e Asp-49 (TEIXEIRA, 2011). Outro fator que pode contribuir para o edema é a produção de segundos mensageiros, os eicosanóides derivados do ácido araquidônico, decorrentes da ação dessas fosfolipases sobre a membrana celular (KINI, 2003).

Ferraz et al. (2014) incubaram músculos do diafragma com 40µg/mL de BjussuV e puderam observar edema com intensa mionecrose. Monteiro-Machado et al. (2015) também observaram desorganização celular, edema e intensa presença de células inflamatórias após 24 horas da injeção de BjussuV no músculo extensor digital de camundongos.

Na atual pesquisa o BjussuV induziu aumento significativo dos níveis de CK encontrados no plasma em relação aos controles. Esses dados estão de acordo com os verificados por outros autores (CALIL-ELIAS et al., 2002; SATURNINO-OLIVEIRA et al., 2012; MONTEIRO-MACHADO et al., 2015). Também foi identificado aumento significativo desses níveis quando induzidos por outras serpentes do gênero *Bothrops* (MEBS et al., 1983; SOUZA et al., 2012; PATRÃO-NETO et al., 2013; HERRERA et al., 2016). No presente estudo, os altos níveis de CK encontrados no plasma estão condizentes com a mionecrose verificada mediante análise histológica após indução com BjussuV.

Dados da literatura mostram que a BthTX-I possui não somente efeitos miotóxicos como também citotóxicos, além de neurotóxicos causando bloqueio neuromuscular, que pode estar associado a degeneração do nervo e músculo (CHIOATO et al., 2007; GEBRIN et al., 2009; PRINHOLATO et al., 2015; MELARÉ et al., 2016). No presente estudo verificou-se mediante análise histológica que a BthTX-I induziu extensas áreas de necrose, infiltrado neutrofílico, edema intersticial e um leve extravasamento de hemácias, corroborando com dados da literatura (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; VERONESE et al., 2005; CORREIA-DE-SÁ et al., 2013). Pereira et al., 2009 injetaram BthTX-I na cavidade peritoneal de camundongos e puderam observar a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal com predominância de neutrófilos 6 horas após a indução; o que indica que essas células

migram precocemente após a lesão (OLIVEIRA et al., 2016), concordando com os resultados presentemente obtidos.

O BthTX-I também induziu elevação nos níveis de CK o que está de acordo com o estudo realizado por Monteiro-Machado et al. (2015) que avaliou os níveis dessa enzima no plasma de camundongos após serem inoculados com a toxina Lys49 de *B. jararacussu*. Outros autores verificaram níveis elevados de CK após indução com Lys49 de *Bothrops jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000) ou de outras espécies de *Bothrops* (CECCHINI et al., 2004; MORA-OBANDO, et al., 2014; DE MOURA et al., 2014). Os níveis elevados de CK verificados neste trabalho, confirmam a necrose verificada no tecido muscular desses animais.

A falta de atividade catalítica de BthTX-I (PLA₂Lys49) não interferiu na sua miotoxicidade, sugerindo que outros mecanismos, desempenhem esse papel (MELARÉ et al., 2016). Dentre os mecanismos, há a hipótese de alterações sarcolemas por interação da região C-terminal do fosfolípido com a membrana (GEBRIM, L. C. et al., 1991; MONTECUCCO et al., 2008) porém esse mecanismo ainda é pouco conhecido.

De acordo com Ayres et al. (2015), a BthTX-II é responsável pela maior degeneração muscular, devido à atividade fosfolipásica. Essa miotoxina causa inibição da bomba de cálcio levando ao seu acúmulo no interior das células, provocando assim a morte celular por necrose (CHOI, 1988; YU 2003). Neste trabalho, a BthTX-II induziu infiltrado inflamatório neutrofílico no músculo necrótico, mas não afetou vasos ou nervos corroborando com os resultados encontrados por GUTIÉRREZ et al. (1991) e por VERONESE et al. (2005). Ainda, de acordo com Gutiérrez et al. (1991) houve maior aumento leucocitário tanto de neutrófilos quanto de macrófagos após 24 horas da injeção, além de terem observado também a regeneração das fibras do músculo após o período de uma semana. Andrião-Escarso et al. (2000) também observaram mionecrose por meio de cortes histológicos após 6 horas da indução com BthTX-II e, após 24 horas, verificaram edema, desestruturação das fibras do músculo, mionecrose e infiltrado leucocitário. Não houve lesão dos capilares, veias ou artérias.

Pereira et al. (2009) injetaram BthTX-II em cavidade peritoneal de camundongos e também observaram a migração de neutrófilos *in vitro* após 6 horas da indução, confirmando a atividade inflamatória dessa toxina (MONTEIRO-MACHADO et al., 2015).

Essa toxina também induziu a um aumento de CK, corroborando com estudos anteriores (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; VERONESE et al., 2005; CECCHINI et al., 2009; DE MOURA et al., 2014; MONTEIRO-MACHADO et al., 2015). Os níveis de CK aqui verificados estão condizentes com os danos visualizados mediante análise histológica.

De acordo com estudos anteriores, ambas as toxinas BthTX-I e BthTX-II induzem quantidades similares de células inflamatórias (PEREIRA et al., 2009). Porém, a Asp49 apresenta maior miotoxicidade (CK) em relação a Lys49 sugerindo que o efeito tóxico dessa enzima é reforçado pela atividade catalítica (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; CECCHINI et al., 2009; PEREIRA et al., 2009).

Ainda, os níveis de CK significativamente mais elevados de BthTX-II em relação ao BthTX-I e ao BjuusuV corrobora os dados descritos anteriormente (VERONESE et al., 2005). A diferença observada entre a BthTX-I e BthTX-II quanto a esses níveis pode estar relacionada com a atividade enzimática da BthTX-II, uma vez que, esta toxina é enzimaticamente ativa e, a BthTX-I é desprovida de atividade enzimática (CINTRA et al., 1993; WARD et al., 1995; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; MARCUSSI, 2007). Além disso, o maior aumento de CK verificado neste estudo com a BthTX-II, em relação a mionecrose observada na análise histológica, pode ser devido a ação cardiotóxica desta toxina, causando vasta lesão no músculo cardíaco, contribuindo assim para o aumento do CK-total (RICARDO, 2013). Outra hipótese pode ser que a secção de tecido analisada não demonstrou todo o dano causado ao total do tecido.

Mora-Obando et al. (2014) injetaram PLA₂ Lys49 e PLA₂ Asp49 em músculo gastrocnêmio de camundongos e obtiveram um maior aumento dos níveis de CK no plasma ao injetarem essas duas miotoxinas em conjunto, que ao injetarem separadamente, fazendo uma menção ao sinergismo desempenhado por essas toxinas. Os mesmos autores ainda mostraram que uma pequena dose de Asp49 adicionada a Lys49 amplifica os efeitos citotóxicos desta segunda, porém quando o contrário é realizado não há amplificação desses efeitos, o que se deve à atividade enzimática de Asp49. Porém, no presente trabalho a BthTX-II apresentou maior miotoxicidade individual que quando integrando a peçonha, o que também ocorre em outros estudos (VERONESE et al., 2005; MONTEIRO-MACHADO et al., 2015). Este fato pode estar associado a dose utilizada, pois em 50 µg de peçonha estão presentes

várias proteínas com atividades diferentes, ou ainda pode estar relacionado a ação dos diferentes componentes do veneno, o que poderia estar inibindo esse sinergismo.

Mecanismos adicionais de ação bem como o envolvimento de receptores presentes na membrana das células vem sendo investigados com o intuito de identificar de que forma as PLA₂ agem. Células de músculo esquelético expressam TLRs que respondem a potenciais ligantes endógenos. Após o reconhecimento do ligante ocorre uma alteração conformacional no domínio intracelular dos TLRs levando ao recrutamento das moléculas adaptadoras, cujas principais são MyD88 e TRIF. Essas moléculas levam a ativação de cascatas de sinalização intracelular culminando na liberação dos fatores transcricionais como o NFκB que é translocado até o núcleo dando início a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais, por sua vez iniciam a resposta inflamatória (LIN et al., 2010; MOREIRA et al., 2013; HENRIQUES-PONS et al., 2014).

Estudo desenvolvido, sugere que os receptores TLR2 e TLR4 reconhecem danos ocorridos após lesão estéril por isquemia e reperfusão renal (PEDREGOSA et al., 2011). Os padrões moleculares associados a danos ativam funções de neutrófilos pela via de sinalização TLR, iniciando resposta inflamatória estéril (HUANG et al., 2015). A ativação do TLR4 induz a produção de citocinas inflamatórias tais como IL-1, IL-6, e TNF-α o que estimula a ativação de macrófagos, contribuindo para a inflamação (FERRAZ et al., 2011; SOUTHERLAND et al., 2006).

No presente estudo, houve expressão significativa de TLR2 no tecido muscular de camundongos Swiss, sugerindo o envolvimento desses receptores nas reações inflamatórias após indução por BjuusuV e pelas PLA₂ miotóxicas BthTX-I e BthTX-II. Moreira et al. (2013) injetaram peçonha de *Bothrops atrox* em peritônio de camundongos com deleção de MyD88 e puderam observar que não houve aumento significativo do total de leucócitos e TNFα, havendo ainda uma redução da produção de IL-1β nos camundongos com deleção de MyD88 em relação aos camundongos selvagens, indicando que essa molécula é importante para ativação de resposta inflamatória após indução por peçonha de serpente.

Leiguez et al. (2014) incubaram macrófagos peritoneais de camundongos com deleção para TLR2 ou MyD88 com fosfolipases A₂ de *B. asper* e puderam observar que houve uma redução na produção IL-1β em relação aos macrófagos peritoneais de camundongos selvagens, demonstrando pela primeira vez a relação de uma PLA₂ secretada de veneno com a ativação da resposta inflamatória mediada por TLR2.

Dessa forma, os resultados obtidos corroboram com os dados da literatura, uma vez que, houve aumento transcricional de TLR2 em relação aos controles após indução por BjussuV e suas sPLAs.

Ainda, os resultados mostraram que tanto o BjussuV quanto as fosfolipases miotóxicas, BthTX-I ou BthTX-II, induziram aumento da transcrição de TLR4. Em estudo realizado por Paiva-Oliveira et al. (2012), os autores sugeriram que a deficiência do TLR4 leva à diminuição do processo inflamatório, e ao aumento da formação de tecido fibroso após 10 dias da injeção de BjussuV, porém, 3 dias após a injeção de BjussuV, tanto camundongos deficientes em TLR4 quanto os selvagens, haviam apresentado mionecrose e infiltrado inflamatório. Ainda, animais com deleção de TLR4 tiveram aumento da área de lesão e infiltrado inflamatório em relação aos animais controle em modelo de envenenamento por BjussuV (OLIVEIRA, 2011) e em lesão pulmonar asséptica (ZHAO et al., 2010), mas diminuição em modelo de isquemia cardíaca (OYAMA et al., 2004). Dessa forma, é possível inferir um papel do TLR4 na modulação da resposta inflamatória após ativação por DAMPs gerados pela ação do BjussuV no músculo gastrocnêmio de camundongos, uma vez que, os DAMPs liberados dos tecidos ou células danificadas formam ligantes endógenos para ativar receptores TLR (BASU et al., 2016).

O reconhecimento de DAMPs por TLR aciona o recrutamento de mais células imunitárias estimulando o processo inflamatório e iniciando a reparação dos tecidos danificados (MEDZHITOV, 2008; FELDMAN et al., 2015). Corroborando com esses dados literários, o aumento da expressão do TLR4 no músculo gastrocnêmio de camundongos pode estar relacionado aos danos provenientes da indução por BjussuV ou, BthTX-I e BthTX-II, uma vez que a expressão foi identificada concomitantemente à mionecrose. Cabe ressaltar que Oliveira (2011) verificou o aumento de infiltrado inflamatório de macrófagos mesmo em animais com deleção desse TLR. Porém há ainda a necessidade de uma melhor investigação dos mecanismos de ativação (se por fosfolipases ou por DAMPs) dos TLR no modelo aqui proposto, pois os camundongos com deleção para TLR4 continuam expressando TLR2 e todos os demais TLRs, o que pode influenciar na resposta inflamatória.

No presente trabalho não foi observada a expressão significativa de TLR5. Também não foram encontrados dados na literatura que relacionem o TLR5 com envenenamento por serpentes. Porém há indícios de que o TLR5 pode ser ativado não só por flagelina bacteriana, mas também por ligantes endógenos produzidos na

sinovia inflamada, desempenhando um papel crucial na inflamação óssea, assim como na artrite reumatóide, podendo ser uma chave para o tratamento de diversas doenças autoimunes (CHAMBERLAIN et al., 2012; KIM et al., 2013; KASSEM et al., 2015). Ainda, estudos importantes tem sido realizados envolvendo agonistas de TLR5, derivados de flagelina, que estão sendo desempenhados na defesa do hospedeiro contra dermatites, mucosites, e diversos tipos de tumores, devido ao perfil na modulação de respostas inflamatórias gerado pelo TLR5 a partir do reconhecimento desses agonistas (BRACKETT et al., 2016; LI et al., 2016). Esses dados mostram que esses TLR são de grande importância para a compreensão de processos inflamatórios.

Menino et al.(2013) tratou camundongos selvagens e deficientes em TLR9 com cepas de fungos e pode observar que o TLR9 é crucial para a sobrevivência de camundongos, sendo que a sua falta acarretou em aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6, e de células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e com consequente morte prematura. Nesse estudo não foi detectado o aumento da expressão do TLR9 no músculo de camundongos após 3 horas de indução por BjuuV, BthTX-I ou BthTX-II, porém foi verificada produção significativa de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , que podem estar relacionadas com o infiltrado neutrofílico após a necrose e ao aumento da expressão de TLR2 e TLR4 nos tecidos musculares. Vale destacar que os receptores TLRs são sensores primários de patógenos e também são responsáveis por reconhecer danos, sendo importantes desencadeadores da inflamação levando a produção de mediadores inflamatórios (KUMAR; et al., 2011).

Os leucócitos, após ativação de TLR, secretam as citocinas TNF- α e IL-1 β (CICILIOT e SCHIAFFINO, 2010), as quais aumentam a inflamação e consequentemente a regeneração dos tecidos (OLIVEIRA et al., 2011). O TNF- α é liberado principalmente por macrófagos, monócitos, neutrófilos e células T. Essa citocina desempenha um importante papel no movimento dos leucócitos tanto em órgãos linfóides normais quanto em tecidos inflamados, devido a ela ser uma das principais reguladoras da expressão de moléculas de adesão (SEDGWICK, et al., 2000), essa citocina, além de induzir moléculas de adesão (MIYATA et al., 1999; SEDGWICK et al., 2000) também é responsável por induzir a migração de leucócitos para o sítio da lesão, seja ela de origem patogênica ou estéril. A literatura relata também a sua participação na indução de alterações no endotélio causando

disfunções da coagulação sanguínea, estimulação do metabolismo oxidativo de fagócitos, além das ações quimiotáticas (SHIBATA et al., 1999). Entre outras funções, esta citocina também estimula a produção de IL-1 β e juntas aumentam o efeito sobre a produção de leucócitos (SAKLATVALA, 1986).

A IL-1 β é produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, que são ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação (OLIVEIRA et al., 2011). Após sua liberação, essa citocina desencadeia inúmeros processos biológicos que modulam a resposta inflamatória, como a produção de óxido nítrico e de eicosanoides via ativação da ciclooxygenase-2 e, a expressão de moléculas de adesão (WANDERLEY, 2014).

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , são importantes mediadores inflamatórios observados em modelos de indução por PLA₂ de *Bothrops* (BURIGO et al., 1996; ZULIANI et al., 2005). Foi verificado que essas citocinas induzem a transcrição gênica de fosfolipases A₂ do indivíduo atingido, o que acarreta em produção de mais citocinas uma vez que as fosfolipases A₂ secretadas de mamíferos podem ser induzidas por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α (YAMASHITA et al., 1994; VADAS et al., 1996) e assim sucessivamente (NAKAZATO et al., 1991; CHACUR, 2004) até que mecanismos induzam a produção de citocinas anti-inflamatórias que vão controlar esse processo. No presente estudo, tanto o BjussuV, quanto as suas toxinas isoladas BthTX-I e BthTX-II, induziram um aumento significativo de TNF- α local e sistêmico quando comparadas ao controle, corroborando com estudos anteriores (PETRICEVICH et al., 2000; WANDERLEY et al., 2014;). Observou-se ainda que os grupos apresentaram produção significativa de IL-1 β no tecido, porém, apenas o BthTX- II foi significativa a nível sistêmico no modelo e tempo estudado. Em estudo desenvolvido por Zuliani et al. (2005) verificaram aumento de IL-1 na cavidade peritoneal de camundongos 3 horas após a injeção de fosfolipases A₂ MT-II (Lys 49) e MT-III (Asp-49) de *Bothrops asper*. No mesmo estudo verificou-se também aumento dos níveis de TNF- α 1 hora após a injeção de MTIII (Asp 49) de *B. asper*. Moreira et al. (2012) também observaram a produção de citocina TNF- α após 1-8 horas da inoculação de peçonha de *Bothrops*.

Em estudo realizado por Chaves et al. (2005), demonstraram que a inibição das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, não influenciou nos níveis de CK, hemorragia ou edema observados após injeção de *B. asper*, sugerindo que a inflamação ocasionada por essas citocinas tem um papel regenerativo. Uma vez que um dos papéis dessas

citocinas é provocar aumento de leucócitos na área de injúria, ocasionando a remoção dos debris provenientes de tecido necrótico, pode-se inferir que as citocinas pro-inflamatórias são responsáveis pela modulação da resposta inflamatória, porém, quando produzidas em excesso, podem agravar os efeitos locais e sistêmicos acarretando em sérios problemas como a perda de função, sepse ou até a morte (CURFS et al., 1997; LIN et al., 2000; SOMMER; WHITE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

A expressão gênica dos TLR2 e TLR4 sugere que esses receptores estão envolvidos no processo inflamatório provocado após o envenenamento ofídico ou por fosfolipases A₂ Lys e Asp secretadas, implicando na sua importância como receptores a serem estudados como chave para o desenvolvimento de terapias mais eficientes contra esses danos ou ainda na regeneração dos tecidos injuriados.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os animais inoculados com BjussuV / BthTX-I / BthTX-II apresentaram importantes alterações na arquitetura histológica muscular.
- Esses animais também apresentaram níveis elevados de CK sérico após 3 horas de envenenamento.
- Verificou-se aumento da expressão dos TLRs 2 e 4 no músculo gastrocnêmio de animais induzidos com BjussuV, BthTX-I e BthTX-II.
- Não houve aumento na expressão de TLR5 e TLR9 no músculo gastrocnêmio dos animais induzidos com BjussuV, BthTX-I e BthTX-II.
- Houve aumento na concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α no tecido muscular gastrocnêmio e no plasma dos grupos de animais induzidos com BjussuV, BthTX-I e BthTX-II.
- Houve aumento na concentração de IL-1 β no tecido muscular gastrocnêmio dos grupos BjussuV, BthTX-I e BthTX-II.
- Houve aumento na concentração de IL-1 β no plasma dos animais induzidos com BthTX-II.
- Não houve aumento de IL-1 β no plasma dos animais induzidos com BjussuV e BthTX-I.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. K. T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol**, v.2, n.8, p. 675–680, 2001.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v.4, p. 499–511, 2004.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

AMARAL, C. F.; DA SILVA, O. A.; GOODY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snakebite. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 877-885, 1985.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxin from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.

ANGULO, Y. et al. Isolation and characterization of four medium size disintegrins from the venoms of Central American viperid snakes of genera *Atropoides*, *Bothrops*, *Cerrophidion* and *Crotalus*. **Biochimie**, v. 107, p. 376-384, 2014.

ARAGÃO, E. A. et al. Shared structural determinations for the calcium-independent liposome membrane permeabilization and sarcolemma depolarization in Bothropstoxin-I, a Lys49-PLA₂ from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Journal Of Biochemistry Cell Biology**, v. 41, p 2588-2593, 2009.

AYRES, R. et al. Different effects of myotoxins bothropstoxin-I and II from *Bothrops* snake venom on cation transport ATPases from murine fast twitch skeletal muscle. **Toxicon**, v. 103, p. 80-84, 2015.

BARBOSA, A. M. et al. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n.4, p. 591-597, 2009.

BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro, EPUB, cap. 63, p. 97-105, 1994.

BARROS, S. F. et al. "Local Inflammation, Lethality and Cytokine Release in Mice Injected with *Bothrops Atrox* Venom." **Mediators of Inflammation**, v. 7, n.5, 339–346, 1998.

BASU, M. et al. Hypoxic stress: impact on a the modulation of TLR2, TLR4, NOD1 and NOD2 receptor and their down-stream signaling genes expression in catla (*Catla catla*). **Mol Biol Rep**, v. 46, n. 1, 2016.

BECKER, C. E.; O'NEILL, L. A. J. Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2007. p. 239-248.

BELL, J. K. Leucine-rich repeats pathogen recognition in Toll-like receptors. **Trends Immunol**, v. 24, p. 528-533, 2003.

BENVENUTI, L. A. Pulmonary haemorrhage causing rapid death after *Bothrops jararacussu* snakebite: a case report. **Toxicon**, v. 42, p. 331–334, 2003.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta médica da Bahia**, v. 81, n. 1, p. 55 – 63, 2011.

BRACKETT, C. M. et al. Toll-like receptor 5- agonist, entolimod, supresses metastasis and induces immunity by stimulating an NK-dendritic-CD8 + T -cell axis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica – dados 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos->

[serpentes/l2-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados](#)> Acesso: 10 de fevereiro de 2016.

BROGGI, A.; GRANUCCI, F. Microbe and danger-induced inflammation. **Mol. Immunol**, v. 63, p. 127–133, 2015.

BUCKLAND, A. G.; WILTON, D. C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A (2). **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, p. 71-82, 2000.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 Biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2009 a.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 237-42, 2009 b.

CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A. M. B.; MELO, P. A. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by Bothrops jararacussu venom. **Histol Histopathol**, v. 17, p. 463-470, 2002.

CAMPOS, M. S. **Expressão de genes homeobox em células de carcinoma epidermoide de boca, estimuladas com EGF e TGF- β** . São Paulo, USP, 2007.

CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci**, v. 72, p. 3366-3370, 1975.

CASAIIS-E-SILVA, L. L. et al. Lemnitoxin, the major component of Micrurus lemniscatus coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipaseA2. **Toxico Lett**, v. 16, 2016.

CAVALCANTE, P. et al. Increased expression of Toll-Like receptors 7 and 9 in myasthenia gravis thymus characterized by active Epstein-Barr virus infection. **Immunobiology**, v.221, n.4, p. 516-527, 2016.

CECCHINI, A. L. et al. Effect of crotaipotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A(2) from Bothrops snake venoms. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 138, n. 4, p. 429-436, 2004.

CHACUR, M. **Efeito nociceptivo induzido por fosfolipases A2 (variantes Lys e Asp49) isoladas do veneno de serpentes Bothrops asper**: caracterização dos

mecanismos centrais e determinantes moleculares. São Paulo, SP: USP, 2004. Originalmente apresentado como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2004.

CHAMBERLAIN, N. D. et al. TLR5, a novel and unidentified inflammatory mediator in rheumatoid arthritis that correlates with disease activity score and joint TNF-alpha levels. **J. Immunol**, v. 189, p. 475–483, 2012.

CHANG, Z. L. Important aspects of Toll-like receptors ligands and their signaling pathways. **Inflammation Research**, v. 59, p. 791-808, 2010.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, p. 1861–1869, 1998.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, p. 171-178, 2005.

CHEN, Z.; THEO, D. P. "Differential Roles of TNFR1 and TNFR2 Signaling in Adult Hippocampal Neurogenesis." **Brain, behavior, and immunity**, v. 30, p. 45-53, 2013.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CHIOATO, L. et al. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, n. 5, p. 1247–1257, 2007.

CHOI, D. W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends Neurosci**, v. 11, p. 465–469, 1988.

CICILIOT, S.; SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. **Curr Pharm Des**, v.16, n 8, p. 906-914, 2010.

CINTRA, A. C. O. et al. Bothropstoxin-I: Amino Acid Sequence and Function. **Journal of Protein Chemistry**, v. 12, p. 57-64, 1993.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 107, p. 14140-14145, 2010.

CLEMENT, H. et al. Isolation, amino acid sequence and biological characterization of an "aspartic-49" phospholipase A2 from Bothrops (Rhinocerocephalus) ammodytoides venom. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1314-1323, 2012.

CORDEIRO, J. V. V.; JACINTO, A. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v. 14, p. 249-262, 2013.

CORREIA-DE-SÁ et al., 2013. Bothropstoxin-I reduces evoked acetylcholine release from rat motor nerve terminals: Radiochemical and real-time video-microscopy studies. **Toxicon**, v 61, p. 16-25, 2013.

COSTA, H. C.; BERNILS, R. S. Répteis Brasileiros: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 3, p. 74-84, 2014.

CREAGH, E. M.; O'NEILL, L. A. J. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. **Trends in immunology**, v. 27, n. 8, p. 352-357, 2006.

CRUVINEL, W. de M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F. HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, p. 742-780, 1997.

D'ALESSIO, P. ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF-alpha are inhibited by a glutathione peroxidase mimic. **Free Radic Biol Med**, n. 6, p. 979-987, 1998.

DE MOURA, A. A. et al. "Purification and Biochemical Characterization of Three Myotoxins from Bothrops mattogrossensis Snake Venom with Toxicity against Leishmania and Tumor Cells." **BioMed Research International**, v. 2014, 13 p, 2014.

DENNIS, E. A. Diversity of Group Types, Regulation and Function of Phospholipase A2. **J. Biol Chem**, v.269, p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, E. A. et al. "Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention." **Chemical reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 2011.

DUNCAN, R. E. et al. "Identification and Functional Characterization of Adipose-Specific Phospholipase A2 (AdPLA)." **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 37, p. 25428–25436, 2008.

EEROLA, L. I. et al. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761 p. 745-756, 2006.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front Biosci**, v. 1, n. 2, p 12-26, 1997.

FELDMAN, N.; ROTTER, A.; OKUN, E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. **Ageing Research Reviews**, v. 24, p. 29-39, 2015.

FERNÁNDEZ, J. et al. Muscle phospholipid hydrolysis by Bothrops asper Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins--distinct mechanisms of action. **FEBS J**, v. 280, n. 16, p. 3878-86, 2013.

FERRAZ, E. G. et. Al. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **Rev. Gaúcha Odontol**, v. 59, n.3, p. 483-490, 2011.

FERRAZ, M. C. et al. An Isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is Active against the in Vitro Neuromuscular Paralysis of *Bothrops jararacussu* Snake Venom and Bothropstoxin I, and Prevents Venom-Induced Myonecrosis. **Molecules**, v. 19, n.5, p. 5790-5805, 2014.

FRISARD, M. I. et al. Toll-like Receptor 4 Modulates Skeletal Muscle Substrate Metabolism. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 5, p. 988-998, 2010.

FROST, R. A.; NYSTROM, G. J.; LANG, C. H. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 283, p. 698-709, 2002.

FROST, R. A.; NYSTROM, G. J.; LANG, C. H. Multiple Toll-like receptor ligands induce an IL-6 transcriptional response in skeletal myocytes. **American Journal of Physiology**, v. 290, n.3, p. 773-784, 2006.

GEBRIM, L. C. et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, v. 37, n. 4, p. 222–229, 2009.

GHOSH, H. et al. Elevated muscle TLR4 expression and metabolic endotoxemia in human aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 70, n. 2, p. 232-246, 2015.

GOMES, M. S. Biochemical and functional characterization of Bothropoidin: the first haemorrhagic metalloproteinase from Bothrops pauloensis snake venom. **J Biochem**, v. 157, n. 3, p. 137-149, 2015.

GOODMAN, M. N. Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. **Am J Physiol**, v. 260, p. 727-730, 1991.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GUDKOV, A. V. **Use of toll-like receptor and agonist for treating cancer.** Panacela Labs, Inc., Roswell Park Cancer Institute, 2012. Disponível em; < <http://www.google.com/patents/EP2486134A1?cl=en>> acesso em: 27 de fevereiro de 2016.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Isolation of a myotoxin from Bothrops asper venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 115-128, 1984 a.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of Bothrops asper. **Experimental and molecular pathology**, v. 40, n. 3, p. 367-379, 1984 b.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A 2 isolated from the venom of the snake Bothrops jararacussu. **Experimental and molecular pathology**, v. 55, n. 3, p. 217-229, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223-1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. Understanding and confronting snakebite envenoming: The harvest of cooperation. **Toxicon**, v. 109, p. 51-62, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev Biol Trop*, v. 34, n. 2, p. 209–14, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, v. 82, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M. Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. **Toxicon** v. 60, p. 676–687, 2012.

GUTIÉRREZ, J.M.; ARROYO, O.; BOLANOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon**, v. 18, p. 603-610, 1980.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorragico y mionecrotico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon**, v. 18, p. 315-321, 1980.

HASHIMOTO, C. et al. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**, v. 52, n. 2, p. 269-279, 1988.

HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, p. 1099–1103, 2001.

HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, p.740-745, 2000.

HENRIQUES-PONS, A. et al. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of dystrophin-deficient skeletal and heart muscle. **Hum Mol Genet**, v. 23, n. 10, 2014.

HERRERA, C. et al. Muscle tissue damage induced by the venom of *Bothrops asper*: identification of early and Late pathological events through proteomic analysis. **Plos Neg Trop Diseases**, 2016.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v.26, p.615-627, 1988.

HUANG, H. et al. DAMPs-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. **Hepatology**, v. 62, p. 600-614, 2015.

IIMURO, Y.; FUJIMOTO, J. TLRs, NF-kappaB, JNK, and Liver Regeneration. *Gastroenterol.* **Res Pract**, 2010.

ISHII, K. J.; COBAN, C., AKIRA, S. Manifold mechanisms of toll-like receptor-ligand recognition. **J Clin Immunol**, v. 25, p. 511-521, 2005.

IZIDORO, L. F. M. et al. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**, v. 85, p. 669–675, 2003.

JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Ann Rev Immunol**, v. 20, p. 197–216, 2002.

KACZOROWSKI, D. J. Toll-like receptors and myocardial ischemia/reperfusion, inflammation, and injury. **Curr Cardiol Rev**, v. 5, n. 3, p. 196-202, 2009.

KASSEM, A. et al. TLR5, a novel mediator of innate immunity-induced osteoclastogenesis and bone loss. **FASEB Journal Article**, v. 29, n. 11, p. 4449-4460, 2015.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11 p. 373–384, 2010.

KIM, S. J. et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis is fostered directly by toll-like receptor 5 ligation and indirectly through interleukin-17 induction. **Arthritis Rheum**, v. 65, p. 2024–2036, 2013.

KINDHAUSER, M. **Communicable Diseases 2002**: Global defense against the infectious disease threat. World Health Organization, Geneva, 2003.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KINI, R.M. Phospholipase A₂ – A complex Multifunctional Protein Puzzle. In: **Venom Phospholipase A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism**. R. Manjunatha Kini. New York, John Wiley Sons, p.1-28, 1997.

KINI, R.M.; DOLEY, R. Structure, function and evolution of three-finger toxins-mini proteins with multiple targets. **Toxicon**, v. 56, p. 855–867, 2010.

KOBLANSKY, A. A. et al., Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 38, p.119–130, 2013.

KRIEG, A. M. A role for Toll in autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 3, n. 5, p. 423-424, 2002.

KRIEG, A. M. et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, v. 374, p. 546–549, 1995.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, p. 16-34, 2011.

LAMBEAU, G. et al. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A₂. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 1575-1576, 1994.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. **TIPS**, v. 20, 1999.

LEADBETTER, E. A., et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll like receptors. **Nature**, v. 416, p. 603-607, 2002.

LEIFER, C. A. et al. Minireview: Linking genetic variation in human Toll-like receptor 5 genes to the gut microbiome's potential to cause inflammation. **Imunol Lett**, v. 162, p. 3-9, 2014.

LEITE, V. L. et al. Método para isolamento da fração miotóxica do veneno de *Bothrops neuwied* e avaliação de sua atividade. **Alfenas**. v. 5. p. 63-68, 1999.

LEMAITRE, B. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, p. 973-983, 1996.

LI, W. CBLB502, an agonist of Toll-like receptor 5, has antioxidant e scavenging free radicals activities in vitro. **Int. J. Biol Macromol**, v. 82, p. 97-103, 2016.

LIEW, F. Y.; LI Y, M. S. Tumor necrosis factor –alpha synergizes with INF-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J Immunol**, v. 145, n. 12, p. 4306-4310, 1990.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P. *Bothrops jararacussu* snake venom induces a local inflammatory response in a prostanoid-and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**. v. 90, p. 134-147, 2014.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, v. 127, p. 117-126, 2000.

LIN, S.C.; LO, Y.C.; WU, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1 signalling. **Nature**, v. 465, p. 885–891, 2010.

LIN, X. et al. Effect of TLR4/MyD88 Signaling Pathway on Expression of IL-1 and TNF-in Synovial Fibroblasts from Temporomandibular Joint Exposed to Lipopolysaccharide. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 11p., 2015.

LOMONTE, B. et al. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). **Toxicon**, v.28, p. 75-81, 1990.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A2 from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? **Acta Chim Slovenica**, v. 58, p. 647-659, 2011.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, p. 520-530, 2012.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v.17, p. 93–105, 1993.

LOWRY, O. H., et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MADHAVI, N.; DAS, U. N. Effect of n-6 and n-3 fatty acids on the survival of vincristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells in vitro. **Cancer Letters**, v. 84, n. 1, p. 31-41, 1994.

MAGRO, A. J. et al. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 323, n. 1, p. 24-31, 2004.

MAMEDE, C. C. Histological and ultrastructural analyses of muscle damage induced by a myotoxin isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Protein Pept Lett**, v. 20, n. 2, p. 192-199, 2013.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosc**, v. 6, n. 521–532, 2005.

MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, v. 21, n. 3, p. 393-404, 1983.

MEGYERI, P.; PABST, K. M.; PABST, M. J. Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. **Immunology** 86(4): 629-35, 1995.

MELARÉ, R. et al. Ultrastructural aspects of mouse nerve-muscle preparation exposed to *Bothrops jararacussu* and *Bothrops bilineatus* venoms and their toxins BthTX-I and Bbil-TX: Unknown myotoxic effects. **Microsc Res Tech**, 2016.

MELGAREJO, A. R. **Serpentes peçonhentas**: principais grupos, identificação, veneno, acidentes e primeiros socorros, 2003.

MENALDO D. L. et al. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from Bothrops pirajai snake venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2545-2558, 2012.

MICERA, A. et al. Toll-Like Receptors and Tissue Remodeling: The Pro/Cons Recent Findings. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 3, 2015.

MILANI JÚNIOR, R. et al. Snake bites by the jararacuçu (Bothrops jararacussu): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **QJM**, v. 90, n. 5, p. 323-334, 1997.

MINAS GERAIS. SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO. Animais Peçonhentos. FUNED. Belo Horizonte, 5. ed. 2014.

MIYATA, R. et al. Short exposure of intestinal epithelial cells to TNF-alpha and histamine induces Mac-1 mediated neutrophil adhesion independent of protein synthesis. **J. Leukoc Biol**, v 66, p.437-446, 1999.

MIZEL, S. B.; WEST, A. P.; HANTGAN, R. R. Identification of a Sequence in Human Toll-like Receptor 5 Required for the Binding of Gram-negative Flagellin. *Journal of Biological Chemistry*. v. 278, p. 23624-23629, 2003.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 2897-2912, 2008.

MONTEIRO-MACHADO, M. et al. Occurrence of sulfated fucose branches in fucosylated chondroitin sulfate are essential for the polysaccharide effect preventing muscle damage induced by toxins and crude venom from Bothrops jararacussu snake. **Toxicon**, v. 98, p. 20-33, 2015.

MORA-OBANDO, D. et al. "Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A2 Myotoxins of Viperid Snake Venom In Vitro and In Vivo." **PLoS ONE**, p. 9-10, 2014.

MOREIRA, V. et al. A phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom activates neutrophils in culture: Expression of cyclooxygenase-2 and PGE2 biosynthesis. **Toxicon**, v. 57, p. 288–296, 2011.

MOREIRA, V. et al. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12-20, 2012.

MOREIRA, V. et al. The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by *Bothrops atrox* venom. **Toxicon**, v. 67, p. 37-46, 2013.

MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, S.; SINHA, S. P. B. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. **Braz J Infect Dis**, 12 p., 2016.

MURAKAMI, M. et al. Regulatory functions of phospholipase A2. **Crit Rev Immunol**, v. 17, n. 3-4, p. 225-283, 1997.

NETO, H. S.; MARQUES, M. J. Microvessel damage by *B.jararacussu* snake venom: pathogenesis and influence on muscle regeneration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 814-819, 2005.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotoamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, p. 363–370, 2005.

OLDENBURG, M. et al. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. **Science**, v. 337, p. 1111–1115, 2012.

OLIVEIRA E. L. P. de. **Participação do receptor Toll-like 4 na lesão neuromuscular induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu***. Niterói, RJ: UFF, 2011. Originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade Federal Fluminense, 2011.

OLIVEIRA, C.M.B. de et al. Citocinas e Dor. Artigo de Revisão. **Rev. Bras. Anestesiologia**, v. 61 n, 2, 2011.

OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 378-391, 2016.

OYAMA, J. et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll like receptor 4-deficient mice. **Circulation**, v.109, n. 6, p. 784-789, 2004.

PAIVA-OLIVEIRA, E. L. et al. TLR4 signaling protects from excessive muscle damage induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 8, p. 1396-1403, 2012.

PANDEY, S.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. **Cold Spring Harb. Pers. In Biology**, v. 7, 2015.

PANUNTO, P. C. et al. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 21-31, 2006.

PATRÃO-NETO, F. C. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, v. 69, p. 55-64, 2013.

PEDREGOSA, J. F. TLR2 and TLR4 expression after kidney ischemia and reperfusion injury in mice treated with FTY720. **Imunofarmacol**, v. 11, n. 9, p. 1311-1318, 2011.

PEREIRA, I. C. et al. Anti-inflammatory activity of *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins BthTX-I and II. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, v. 15, n. 3, p. 527-545, 2009.

PETRICEVICH, V. L. et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p. 1253-1266, 2000.

PICARD, C. et al. "Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency." **Medicine**, v. 89, n. 6, 403–425, 2010.

PICKA, M. C. M. **Expressão gênica relativa de receptores toll-like 2 e 4 e citocinas em infecção experimental por cepas de *Trypanosoma cruzi* de diferentes origens**. Botucatu, SP: FMB-UNESP, 2011. Originalmente apresentado como Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

PINHO, F. M. O; BURDMANN, E. A. Fatal cerebral hemorrhage and acute renal failure after young *Bothrops jararacussu* snake bite. **RENAL FAILURE**, v. 23, n. 2, p. 269–277, 2001.

PITTMAN, K.; KUBES, P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. **J. Innate Immun**, v. 5, p. 315–323, 2013.

PRINHOLATO da SILVA, C. et al. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 3, n. p. 21-44, 2015.

PRUZANSKI, W. et al. Serum phospholipase A2 correlates with disease activity in rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 15, n. 9, p. 1351-1355, 1988.

QUEIROZ, G. P. et al. Interespecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genu. **Phyllomedusa**. v. 7, p. 45-90, 2008.

QUEIROZ, L. P.; MORTIZ, R. D. Acidente botrópico em Florianópolis / Bothropic snake accidents in Florianopolis. **ACM arq. catarin. med**, v. 18, n. 3, p.163-166, 1989. (RESUMO)

QUEIROZ, L. S. et al. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 22, n. 3, p. 339-346, 1984.

RAEBURN, C. D. et al. - Cytokines for surgeons. **Am J Surg**, v.183, p. 268-273, 2002.

RAMONER, Reinhold et al. Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A2. *Blood*, v. 105, n. 9, p. 3583-3587, 2005.

RAUPACH, B. et al. Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun*, v. 74 n. 8, p. 4922-4926, 2006.

RAWAT, R. et al. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. **Am. J. Pathology**, v. 176, p. 2891-2900, 2010.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, n. 6, p. 475-80, 1997.

RICARDO, H. D. **Estudo da cardiotoxicidade das peçonhas de serpentes viperídeas**. Rio de Janeiro, RJ: UFRJ/ ICB, 2013. Originalmente apresentado como tese de doutorado, Universidade de Rio de Janeiro, 2013.

RICHMOND, B. L. et al. Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A (2)-deficient mice. **Gastroenterology**, v. 120, p. 1193-1202, 2001.

RODRIGUES, M. A. et al. Rat atrial responses to *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) snake venom. **Toxicology**, v. 323, p. 109-124, 2014.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Essential immunology**. Blackwell, 20. ed, v. 18, p. 374-396, 2004.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous Animals and Their Venoms**. New York: Academic Press, v. 2, p. 345-403, 1971.

RUEDA, A. Q. et al. Biochemical Characterization, Action on Macrophages, and Superoxide Anion Production of Four Basic Phospholipases A₂ from Panamanian *Bothrops asper* Snake Venom. **Biomed Res Int**, v. 2013, 2013.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation: review. **J. Pathol**, v. 86, p. 185-274, 1977.

SAKLATVALA, J. Tumour necrosis factor α stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage, **Nature**, v. 322, n. 6079, p. 547–549, 1986.

SANTOS, M. C. et al. A eficácia do antiveneno Botrópico-Crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 34, n. 2, p. 77-83, 1992.

SARTIM, M. A. et al. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIIId metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. **Arch Toxicol**, 2015.

SATURNINO-OLIVEIRA, J. et al. "Pulsed Ultrasound Therapy Accelerates the Recovery of Skeletal Muscle Damage Induced by Bothrops Jararacussu Venom." **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 6, p. 488–496, 2012.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, p.1246-1259, 2006.

SEDGWICK, J. D. et al. Tumor necrosis factor: a master regulator of leucocyte movement. **Immunol Today**, v 21, p. 110-113, 2000.

SEIS, D. A.; DENNIS E. A. The expanding superfamily of phospholipase A (2) enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SHARMA, R.; ANKER, S. D. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. **Int J Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 161-171, 2002.

SILVA, T. P. et al. Connarus favosus Planch: An inhibitor of the hemorrhagic activity of Bothrops atrox venom and a potential antioxidant and antibacterial agent. **J Ethnopharmacol**, v. 13, n. 183, p. 166-75, 2016.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1488, n. 1, p. 1-19, 2000.

SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, p. 201–209, 2000.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, in: Beaulieu, P. et al. **Pharmacology of Pain**. 1. Ed, Seattle, IASP Press, p. 279-302, 2010.

SOUTHERLAND, J. H. et al. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. **Periodontol 2000**, v. 40, p. 130–143, 2006.

SOUZA, C. A. T. de et al. Local and systemic biochemical alterations induced by Bothrops atrox snake venom in mice. **J Venom Res**, v. 3, p. 28-34, 2012.

SOUZA, I. L. M. de. **Estudo in vitro das citocinas envolvidas na resposta inflamatória de macrófagos murinos à infecção pelo vírus da dengue.** Florianópolis, UFSC, 2012.

STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Current opinion in structural biology**, v. 5, n. 3, p. 383-390, 1995.

TAKAYAMA, K. et al. Monomeric Re lipopolysaccharide from Escherichia coli is more active than the aggregated form in the Limulus amebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. **J. Biol. Chem**, v. 269, p. 2241–2244, 1994.

TAKEDA, K. et al. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**. v. 21, p. 335-376, 2003.

TANG, D. PAMPs and DAMPs: Signals that spur autophagy and immunity. **Immunol Rev**, v. 249, p. 158–175, 2012.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by Bothrops asper venom. **Toxicon**, v. 54, p. 988-997, 2009.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, v. 15, n. 8, p. 947-962, 2003.

TEIXEIRA, L. F. **Efeitos locais e sistêmicos de BdipTX-I, uma nova fosfolipase A₂ Lys-49 isolada do veneno da serpente de Bothrops diporus.** Porto Velho, RO: UNIR, 2014. Trabalho originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Rondonia, 2011.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 5, p. 1173-1187, 2010.

UNDERHILL, D. M. et al. A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, p. 14459-14463, 1999.

VADAS, P. et al. Secretory non-pancreatic phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2 expression by tracheobronchial smooth muscle cells. **J Biochem**, v. 235, n. 3, p. 557-563, 1996.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. **Laboratory investigation**, v. 55, n. 4, p. 391-404, 1986.

VERONESE, E. L. G. et al. Inhibition of the myotoxic activity of Bothrops jararacussu venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of Tabernaemontana catharinensis A. DC.(Apocynaceae). **Phytomedicine**, v. 12, n. 1, p. 123-130, 2005.

WALTER, S., et al. Role of Toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Cell Physiol Biochem**, v. 20, p. 947-956, 2007.

WANDERLEY, C. W. de S. et al. Bothrops jararacussu snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid-and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134-147, 2014.

WATANABE, L. et al. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49 phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from Bothrops moojeni complexed with stearic acid. **Biochimie**, v. 87, n. 2, p.161-167, 2005.

WOLF, G. et al. – Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 1072-1077, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cataloguing-in-Publication Data Rabies and envenomings** : a neglected public health issue : report of a Consultative Meeting, World Health Organization, Geneva, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases: the 17 neglected tropical diseases**. World Health Organization, 2013.

WU, M. et al. Pressure and inflammatory stimulation induced increase of cadherin-11 is mediated by PI3K/Akt pathway in synovial fibroblasts from temporomandibular joint. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 10, p. 1605–1612, 2013.

YAKOVLEV, A. G.; FADEN, A. I. Mechanism of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. **Neuro Rx**, v. 1, p. 5-16, 2004.

YAMASHITA, S. et al. Group II phospholipase A2 in invasive gastric cancer cell line is induced by interleukin 6. **Biochem Biophys Res Commun**, v 198, n. 3, p. 878-884, 1994.

YOON, S. I. et al. Structural basics of TLR5-flagelin recognition and signaling. **Science**, v. 335, p. 859-864, 2012.

YU, S. P. Na⁺, K⁺-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. **Biochemical pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1601-1609, 2003.

ZAMUNER, S. R. et al. Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, p. 1505–1513, 2001.

ZAMUNER, S. R. Inflammation induced by Bothrops asper venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, p. 806–813, 2005.

ZAQUEO, K. D. et al. BbrzSP-32, the first serine protease isolated from Bothrops brazili venom: Purification and characterization. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 195, p. 15-25, 2016.

ZENI, A. L. B. et al. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of Bothrops jararacussu venom in mice. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 664-676, 2007.

ZHANG, J. M.; NA, J. Cytokines inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin** v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHAO, H. et al. TLR4 is a negative regulator in noninfectious lung inflammation. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 5308-5314, 2010.

ZULIANI, J. P. et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A 2 isolated from Bothrops asper snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 335-346, 2005.

ANEXO A - Protocolo de liberação do comitê de ética no uso de animais – CEUA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RONDÔNIA

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto (protocolo 2014/07) intitulado “**O PAPEL DOS RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO “TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR)” E “NOD-LIKE RECEPTOR (NLR)” NA INFLAMAÇÃO LOCAL INDUZIDA POR UMA METALOPROTEINASE E DUAS FOSFOLIPASES A2 ISOLADAS DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararacussu***”, sob a responsabilidade do Dra. Juliana Pavan Zuliani está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), em 11 de setembro de 2014.

This is to certify that the work (protocol 2013/01) entitled “The role of pattern recognition receptors Toll-like receptor (TLR) e NOD-like receptor (NLR) in local inflammation induced by one metalloproteinase and two phospholipase A₂ isolated from snake venom *Bothrops jararacussu*”, by Dr. Juliana Pavan Zuliani is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimental and was approved by Ethic Commission for the Use of Animals of the Oswaldo Cruz Rondônia Foundation (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), September 11, 2014.

Porto Velho, 11 de setembro de 2014.

Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA)
Ms. Luiz Herman Soares Gil
Dr. Andreimar M. Soares
Dr. Roberto Nicoleti
Ms. André de Abreu Rangel Aguirre

APÊNDICE A - Dosagem de endotoxina pelo método LAL- Limulus Amebocyte Lysate.

